

Synthetische RNA-Schalter zur Regulation zellulärer Prozesse

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte Dissertation von

Diplom Biochemikerin

Janina Langner

aus Frankfurt am Main

1. Referentin: Prof. Beatrix Süß

2. Referent: Prof. Gerhard Thiel

Tag der Einreichung: 02.10.2013

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2013

Darmstadt, 2013

D17

Ich danke ...

... Prof. Dr. Beatrix Süß für die Möglichkeit meine Arbeit in ihrem Labor durchführen zu dürfen und für die gute Betreuung

... Prof. Dr. Gerhard Thiel für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens

... Dr. Roswitha Löwer und Dr. Nina Fuchs für die Unterstützung bei der Durchführung des Kooperationsprojektes zu HERV-K

... Prof. Andres Merits und Liane Ülper für ihre Unterstützung bei der Durchführung des Kooperationsprojektes zu SFV

... allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für ihren Beistand und die schöne Zeit

... meinen Eltern für ihre Ermunterungen

... meinem Zukünftigen für die moralische Unterstützung und sein Verständnis

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	i
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	2
2.1 RNA-Schalter	2
2.1.1 Riboswitches	2
2.1.2 Artificielle Aptamere	3
2.1.3 Ribozyme.....	12
2.2 Spleißen.....	15
2.2.1 Spleißmechanismus	15
2.2.2 Alternatives Spleißen	17
2.2.3 Spleißregulation durch RNA-Schalter	20
2.3 Viren.....	21
2.3.1 RNA-Viren	21
2.3.2 Retroviren	31
2.3.3 Humane endogene Retroviren	33
2.4 Zielsetzung.....	40
3 Material und Methoden	42
3.1 Material	42
3.1.1 Chemikalien	42
3.1.2 Hilfsmittel	43
3.1.3 Geräte.....	44
3.1.4 Kommerziell erhältliche Systeme	46
3.1.5 Verwendete Enzyme und Proteine	46
3.1.6 Verwendete Oligonukleotide	48
3.1.7 Verwendete Plasmide	56
3.1.8 Konstruierte Plasmide	57
3.1.9 Verwendete Stämme.....	60
3.2 Medium, Puffer und Lösungen	61
3.2.1 Medien für prokaryotische Zellen	61
3.2.2 Medien für eukaryotische Zellen	61
3.2.3 Puffer	62

3.2.4	Gele	64
3.2.5	Westernblot Puffer.....	65
3.3	Methoden.....	65
3.3.1	Allgemeine Methoden	65
3.3.2	Gelelektrophorese	66
3.3.3	Methoden zur Behandlung prokaryotischer Zellen	67
3.3.4	Methoden zur Behandlung eukaryotischer Zellen	68
3.3.5	Präparation von DNA	72
3.3.6	Analyse von DNA	72
3.3.7	Präparation von RNA	74
3.3.8	Markierung von RNA.....	76
3.3.9	Analyse von RNA	77
3.3.10	Präparation von Proteinen	80
3.3.11	Analyse von Proteinen	81
4	Ergebnisse	83
4.1	Biochemische Analyse der RcRE von HERV-K.....	83
4.1.1	Analyse des minimalen Rec Bindungsmotivs auf RcRE pck30	83
4.1.2	Einfluss von Mutationen der purinreichen Motive auf die Bindung von Rec an das RcRE pck30	87
4.2	Regulation der viralen Replikation durch RNA-Schalter.....	93
4.2.1	Regulation der viralen Replikation durch das Tetrazyklin bindende Aptamer im Bereich des subgenomischen Promotors.....	93
4.2.2	Optimierung der Regulation durch das Tetrazyklin bindenden Aptamer	99
4.2.3	Optimierung der Infektionsbedingungen.....	102
4.2.4	Regulation der SFV Replikation durch ein Theophyllin abhängiges hammerhead Ribozym.....	106
4.3	Regulation des alternativen Spleißens durch das TetR bindende Aptamer	111
4.3.1	Klonierung von TetR-Varianten in pWHE211	111
4.3.2	Analyse der TetR Expression mittels Western Blot.....	114
4.3.3	Regulation des alternativen Spleißens des pMA-Minigens mit dem TetR bindenden Aptamer.....	115
4.3.4	Spleißregulation in einem GFP-Minigen	128
4.3.5	Regulation des alternativen Spleißens im mRNA-Kontext der Luziferase.....	133
5	Diskussion.....	152
5.1	Bindung von Rec an RcRE pck30.....	152

5.1.1	Bindungsmodell von Rec	153
5.2	Replikationsregulation von SFV	154
5.2.1	Replikationsregulation durch das Tetrazyklin bindende Aptamer	154
5.2.2	Replikationsregulation durch das Theophyllin abhängige hammerhead Ribozym 155	
5.2.3	Vergleich des Regulationsansatzes zur Replikationsregulation	156
5.3	Spleißregulation	156
5.3.1	Spleißregulation im pMA-Minigen	156
5.3.2	Spleißregulation im GFP-Minigen	158
5.3.3	Spleißregulation in der Luziferase-mRNA	159
5.3.4	Vergleich des Regulationsansatzes zur Spleißregulation	161
5.4	Schlussfolgerung und Ausblick	162
6	Referenzen	164
7	Lebenslauf	170
8	Publikationen	171
9	Ehrenwörtliche Erklärung	172

Abkürzungen

AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
Amp	Ampicillin
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	<i>circa</i> (lat.: "ungefähr")
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
et al.	<i>et alii</i> (lat.: "und andere")
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FCS	fötales Kälberserum
fwd	<i>forward</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HTDV	<i>human teratocarcinoma-derived virus particles</i>
Kap.	Kapitel
LILBID	<i>laser induced liquid beam ionisation/desorption</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
Mg ²⁺	Magnesiumionen
mind.	mindestens
miRNA	<i>micro RNA</i>
MOI	Multiplizität der Infektion
MQ	Millipore-Wasser
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Molekulargewicht
NLS	<i>nuclear localisation signal</i>
ORF	Offener Leserahmen
PCR	Polymerasekettenreaktion
RcRE	Rec responsives Element
Rec	<i>regulator of expression encoded by central open reading frame</i>
Rev	<i>regulator of virion</i>
rev	<i>reverse</i>

Abkürzungen

RNA	Ribonukleinsäure
RRE	Rev responsive Element
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
shRNA	<i>short hairpin</i> RNA
SS	Spleißstelle
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
TetR	<i>Tet Repressor</i>
tRNA	Transfer-RNA
UTR	<i>untranslated region</i>
Vol	Volumen
VRP	<i>viral replicon particle</i>
z. B.	zum Beispiel

Abkürzungen

Einheiten

bp	Basenpaar
bar	Druckeinheit
°C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde
min	Minute
sec	Sekunde
l	Liter
M	Molar
Mol	Stoffmenge ($6 \cdot 10^{32}$ Teilchen)
U	Aktivität (Units)
V	Volt
W	Watt
v/v	Volumen pro Volumen (Volumenprozent)
w/v	Masse pro Volumen
g	Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m/s}^2$)
rpm	Umdrehungen pro Minute
cps	<i>counts per second</i>
cpm	<i>counts per minute</i>

Größenordnungen

Mio.	Million (10^6)
k	Kilo (10^3)
m	Milli (10^{-3})
μ	Mikro (10^{-6})
n	Nano (10^{-9})
p	Piko (10^{-12})
f	Femto (10^{-15})

Nukleotide

A	Adenosin
C	Cytosin
G	Guanosin
T	Thymidin
U	Uridin

1 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, Strategien zur Etablierung synthetischer, RNA basierter Genschalter zu entwickeln. In einem Teilprojekt sollte die virale Replikation des RNA-Virus Semliki Forest Virus (SFV) mit einem RNA-Schalter reguliert werden. Hierzu wurde das Tetrazyklin bindende Aptamer in den subgenomischen Promotor inseriert, um bei Ligandbindung mit der Promotorerkennung zu interferieren. In einem weiteren Ansatz wurde das Theophyllin abhängige, selbstspaltende *hammerhead* Ribozym in die 3'-UTR eingebracht. Dies sollte ligandabhängig zur Degradation der viralen RNA führen. Als Testsystem wurde ein SFV Replikon verwendet, welches für GFP statt der Strukturproteine codiert. Dadurch konnte die Replikation über die GFP-Expression beobachtet werden. Trotz intensiver Optimierung der Infektions- und Schaltbedingungen konnte mit keinem Konstrukt eine signifikante Regulation erreicht werden.

In einem zweiten Projekt sollte das alternative Spleißen mit Hilfe eines TetR bindenden Aptamers kontrolliert werden. Hierzu wurde ein Minigen eingesetzt, welches das Aptamer direkt *downstream* der 5'-Spleißstelle im Intron enthält. Das Aptamer kontrolliert dadurch ligandabhängig den Zugang zur Spleißstelle. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Expression von TetR der Spleißprozess behindert wurde. Die Zugabe von Doxycyclin, welches in TetR eine Konformationsänderung induziert und die Bindung an das Aptamer inhibiert, ermöglichte das Spleißen wieder. Es wurden verschieden starke 5'- und 3'-Spleißstellen sowie unterschiedlich stabile Aptamere getestet. Eine starke Spleißstelle und ein destabilisiertes Aptamer bewirkten die stärkste Regulation. Zusätzlich wurde das Aptamer auch in einem anderen Minigen erfolgreich getestet.

Das System wurde daraufhin in den Kontext einer mRNA überführt. Hierzu wurden die besten Intron-Aptamer-Kombinationen aus dem Minigen an verschiedenen Stellen in das Luziferasegen inseriert. Der stärkste Regulationsfaktor lag bei 1,7. Das zeigt, dass die im Minigen erhobenen Daten nicht direkt auf einen mRNA-Kontext übertragbar sind und an den neuen Kontext angepasst werden müssen.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde der Rec-RcRE-Komplex des humanen endogenen Retrovirus HERV-K untersucht, welcher für den Export gespleißter und ungespleißter viraler RNA notwendig ist. Es konnte gezeigt werden, dass purinreiche Motive (GGAA-, GGA- und AAGG-Motiv) an der Bindung beteiligt sind. Allerdings war die Dissoziationskonstante der Motive allein 50-fach schlechter als die des gesamten RcRE Elements. Mutationsanalysen und Exportstudien führten zu einem Bindungsmodell, wonach Rec in erster Linie an die zentrale Region der komplex gefalteten Struktur des RcRE pck30 bindet, gefolgt von einer kooperativen Bindung an die weniger affinen, purinreichen Bindungsmotive. Vermutlich wird der Exportkomplex aus Rec und dem RcRE durch die Bindung von Rec an die purinreiche Motive stabilisiert.

2 **Einleitung**

2.1 **RNA-Schalter**

2.1.1 **Riboswitches**

Riboswitches sind natürliche RNA-Schalter, welche die Genexpression regulieren. Diese Regulation erfolgt durch die spezifische Bindung des jeweiligen Liganden und unabhängig von Proteinen. Riboswitches wurden in allen drei Domänen des Lebens gefunden und erstmals vor 10 Jahren beschrieben. Die meisten bakteriellen Riboswitches liegen im 5'-UTR von mRNAs, die für Proteine codieren, die den Metabolismus oder Transport von mit dem Liganden verwandten Metaboliten katalysieren. Sie bestehen aus einer Aptamerdomäne, die einen Sensor darstellt, der in den meisten Fällen zelluläre Metabolite bindet. Die Bindung des Liganden induziert eine Konformationsänderung in der Expressionsplattform, die dann die Expression der regulierten Gene beeinflusst. Meist wird über den Riboswitch die Transkriptionstermination durch die Ausbildung eines Terminators und Antiterminators oder die Translationsinitiation über die Zugänglichkeit der Ribosomenbindestelle reguliert.¹

Die Mehrheit der Riboswitches bildet Bindungstaschen aus, welche die komplementäre Struktur des Liganden aufweisen und ihn einschließen. Meist erfolgt die Wechselwirkung mit dem Ligand über spezifische Wasserstoffbrücken und elektrostatische Wechselwirkungen. Durch eine Kombination aus Konformationsselektion und *induced fit* wird der Ligand gebunden. Durch diese passgenaue Ligandbindung kommt es bei chemisch verwandten Stoffen zu sterischen Hinderungen bei der Bindung. Dies ermöglicht es Riboswitches zwischen chemisch sehr ähnlichen Strukturen zu diskriminieren.¹

Das Ligandenspektrum von Riboswitches umfasst Nukleobasen (Purine und deren Derivate) sowie Coenzyme von Proteinen und verwandte Moleküle, Aminosäuren, Ionen und phosphorylierte Zucker. Manche Riboswitches benötigen für die Ligandbindung zusätzliche Metallionen wie z. B. Magnesium- oder Kaliumionen, um die negative Ladung des Phosphatrückgrats der RNA und teilweise der Liganden abzuschirmen.¹

Riboswitches sind komplex gefaltet und verfügen meist über Knotenpunkte von mehreren Helices oder Pseudoknoten. Die einzelnen Aptamerdomänen verschiedener Riboswitches haben jedoch keine weitere strukturelle Ähnlichkeit untereinander. Die Riboswitchstruktur korreliert auch nicht mit dem gebundenen Liganden, so weisen die drei Klassen der S-Adenosyl-Methionin (SAM) bindenden Riboswitches unterschiedliche Sequenzen auf und falten sich auch unterschiedlich, obwohl sie den gleichen Liganden erkennen.¹⁻⁴ Es ist eine extraordinary Eigenschaft von RNA, unterschiedliche Konformationen zur Bindung des gleichen Liganden zu entwickeln.

Im Folgenden werden einzelne Riboswitches näher vorgestellt.

Die drei Vitaminderivate Thiaminpyrophosphat, Flavinmononukleotid und Adenosylcobalamin werden von „klassischen“ Riboswitches gebunden, welche die Genexpression über die Bindung von Metabolitderivaten an die mRNA regulieren. Sie sind in dem 5'-UTRs des Biosyntheseoperons lokalisiert und regulieren die Operons der Vitamine B₁, B₂ und B₁₂.⁵⁻⁷

Das *glmS*-Riboswitch-Ribozym wirkt z. B. über einen anderen Mechanismus. Es koppelt die Bindung des Metaboliten an die Spaltung der eigenen RNA und initiiert so den Abbau der mRNA. Dieser Riboswitch liegt typischerweise in grampositiven Bakterien vor und bindet Glucosamin-6-Phosphat. Er ist in der Lage viele verschiedene, chemisch ähnliche Komponenten zu erkennen und kann so den metabolischen Status der Zelle beurteilen.⁸⁻¹⁰

Der TPP-Riboswitch in Eukaryoten reguliert dagegen die Genexpression durch alternatives Spleißen.¹¹

Tandem-Riboswitches besitzen zwei Sensordomänen, die hintereinander liegen. Das ist z. B. bei vielen Glycin bindenden Riboswitches der Fall, die über zwei durch eine Verbindungssequenz gekoppelte Aptamerdomänen verfügen. Diese gehen untereinander tertiäre Interaktionen ein.¹²

Eine weitere Art der RNA-Schalter sind RNA-Thermometer. Diese liegen innerhalb einer mRNA und reagieren auf bestimmte Temperaturen. Durch ihre Sekundärstrukturen beeinflussen sie die Zugänglichkeit der Ribosomenbindestelle und somit die Translationseffizienz. RNA-Thermometer kommen in den mRNAs von Virulenzgenen, Hitze- und Kälteschockgenen vor, da hier eine sehr schnelle, temperaturabhängige Regulation benötigt wird.¹³

Der SAM-Riboswitch in *Listeria monocytogenes* verfügt über einen Tandemsensor, der eine Aptamer und eine Thermometerdomäne enthält. Er kann nur auf seinen Liganden reagieren, wenn die Temperatur für eine Infektion geeignet ist, denn dann ist das eingebaute RNA-Thermometer ungefaltet.¹⁴

2.1.2 Artificielle Aptamere

Aptamere sind kleine, strukturierte RNA Moleküle, die spezifisch an einen Liganden binden. Aptamere werden über systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*, SELEX) aus einer großen Bibliothek an unterschiedlichen Sequenzen gefunden. In Abbildung 2-1 ist schematisch eine SELEX dargestellt.

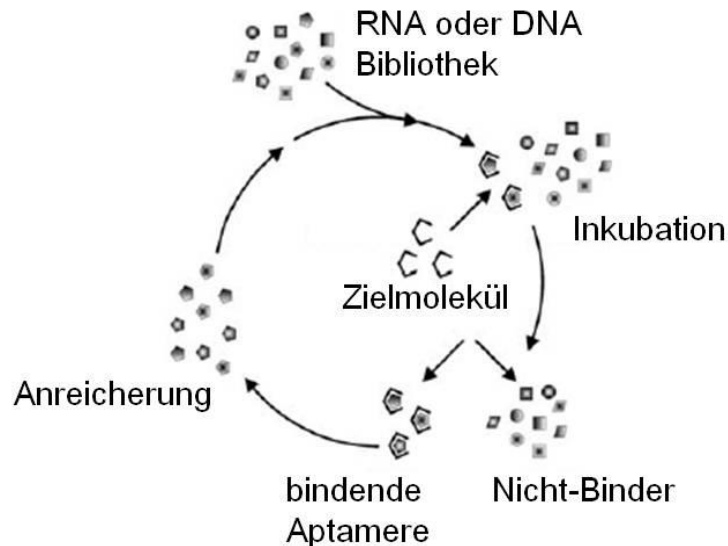


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung einer SELEX.

Im ersten Schritt wird die DNA- oder RNA-Bibliothek mit dem Zielmolekül inkubiert und dann die bindenden Aptamere von den Nicht-Bindern abgetrennt. Im letzten Schritt werden die bindenden Aptamere z. B. durch eine PCR angereichert und eine neue Selektionsrunde mit der angereicherten Bibliothek gestartet. Modifiziert nach Weigand und Süß¹⁵.

Eine SELEX kann, wie in Abbildung 2-1 gezeigt, in drei Schritte aufgeteilt werden. Als erstes wird eine RNA- oder DNA-Bibliothek mit 20 bis 80 nt langen randomisierten Sequenzen mit dem Zielmolekül inkubiert. Als Zielmoleküle können anorganische sowie organische Moleküle, Peptide, ganze Proteine, aber auch Mischungen aus Zielmolekülen, ganzen Zellen oder Organismen eingesetzt werden.¹⁶

Die DNA-Bibliotheken umfassen meistens 10^{13} bis 10^{15} Sequenzen und werden über die virale T7-Polymerase *in vitro* in RNA transkribiert. Die randomisierte Sequenz wird immer von bekannten Sequenzen eingerahmt, die als *Primer*-Bindestellen in der PCR und cDNA-Synthese dienen.¹⁶

Im nächsten Schritt müssen diejenigen Aptamere, welche an das Zielmolekül binden von denen, die nicht oder nur schlecht binden, abgetrennt werden. Dies ist der kritischste Schritt innerhalb einer SELEX, da er die späteren Bindungseigenschaften des selektierten Aptamers bestimmt. Hierzu wird meist das Zielmolekül immobilisiert und die nicht bindenden Aptamere durch Waschen entfernt.^{16, 17}

Durch eine cDNA-Synthese wird dann die RNA-Bibliothek in cDNA umgeschrieben und durch PCR amplifiziert. Hierbei wird über die *Primer* ein T7-Promotor eingebracht, der eine *in vitro* Transkription erlaubt. Mit der neuen angereicherten Bibliothek wird eine weitere Selektionsrunde gestartet. Nach mehreren Selektionsrunden werden die einzelnen selektierten Sequenzen analysiert. Die Anzahl an nötigen Runden variiert je nach Zielmolekül, dem Aufbau der Bibliothek, den Selektionsbedingungen und der Effizienz der Abtrennung zwischen bindenden und nicht bindenden Aptameren.^{16, 17}

Die ersten beiden SELEX Experimente wurden 1990 durchgeführt. Eine erfolgte gegen die T4-DNA-Polymerase *gp43* und die andere gegen Farbstoffe wie Cibacron blue.^{17, 18}

Für die Selektion eines Aptamers gegen den Farbstoff Cibacron blue wurde eine Bibliothek mit 10^{15} verschiedenen Sequenzen verwendet. Die Farbstoffe wurden an eine Agarosesäule gekoppelt. Durch die Inkubation mit der Bibliothek konnten Nicht-Binder gewaschen werden. Nach der Sequenzanalyse wurde zur Untersuchung der für die Bindung an das Zielmolekül wichtigen Nukleotide eine weitere Selektion durchgeführt. Hier wurde die Sequenz des bindenden Aptamers durch Mutagenese zufällig variiert und wieder bindende Sequenzen angereichert. Diese wurden sequenziert und miteinander verglichen. Somit konnten konservierte Bereiche, die für die Funktionalität des Aptamers wichtig sind, bestimmt werden.¹⁷

Im Folgenden sollen drei durch SELEX gefundene Aptamere näher vorgestellt werden.

2.1.2.1 Tetrazyklin bindendes Aptamer

Durch SELEX wurde das Tetrazyklin bindende Aptamer gefunden.¹⁹ Tetrazyklin ist ein Antibiotikum, welches die prokaryotische Translation hemmt. Es inhibiert die Bindung der Aminoacyl-tRNA an die ribosomale A-Seite.^{20, 21} Es ist ein flaches, polyzyklisches Molekül mit einem aromatischen Ring, das in Abbildung 2-2 dargestellt ist.

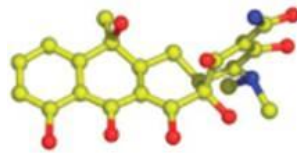


Abbildung 2-2: Struktur von Tetrazyklin.

Kohlenstoffatome sind gelb, Sauerstoffatome rot und Stickstoffatome sind blau. Entnommen aus Förster et al.²².

Die Struktur des Tetrazyklin bindenden Aptamers wurde über biochemische Strukturanalysen (*enzymatic and chemical probing*)^{19, 23} und Kristallisation²⁴ analysiert.

Es hat eine h-förmige Struktur mit drei Stämmen und zwei Schleifen. Für die Tetrazyklinbindung sind die Nukleotide des Knotenpunkts J1-2 und der Schleife L3 wichtig, wobei auch das von Tetrazyklin chelatierte Magnesiumion erkannt wird. Tetrazyklin wird im Zentrum einer irregulären *triple* Helix aus den Regionen J1-2, J2-3 und der Schleife L3 gebunden. Die Basis dieser Helix wird durch das Basentriplet A9, A44 und A55 geformt.²³⁻²⁵. Das Aptamer ist in Abbildung 2-3 dargestellt.

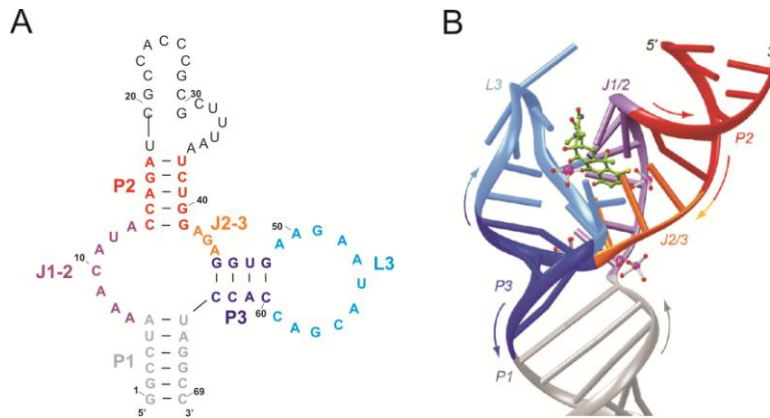


Abbildung 2-3: Struktur des Tetrazyklin bindenden Aptamers.

A: 2D Struktur des Tetrazyklin bindenden Aptamers. P steht für Stamm, J für Verzweigungspunkt und L für Schleife. B: Kristallstruktur des Tetrazyklin bindenden Aptamers mit gebundenem Tetrazyklin (grün). Das Aptamer komplexiert Magnesiumion (magenta), was mit Hydrathülle (rot) gezeigt ist. Entnommen aus Xiao et al.²⁴.

Es zeigte sich, dass der P1 Stamm des Aptamers nicht an der Tetrazyklinbindung beteiligt ist und daher variiert werden kann. Auch die Stammschleifenstruktur auf dem Stamm P2 ist nicht für die Tetrazyklinbindung nötig und kann gegen eine andere Schleife ausgetauscht werden, ohne die Bindung an Tetrazyklin zu beeinflussen.²⁴

Das Aptamer ist bereits ohne gebundenen Liganden in großen Bereichen vorgeformt und verändert seine Gesamtstruktur durch die Ligandbindung kaum. Die Bindung von Tetrazyklin stabilisiert lediglich eine bereits vorhandene Struktur.^{22, 23, 25}

Der Ligand Tetrazyklin wird in zwei Stufen equimolar mit einer Dissoziationskonstante von 770 pM vom Aptamer gebunden.^{22, 25, 26} Dies ist die niedrigste bisher bekannte Dissoziationskonstante für ein RNA-Aptamer. Im ersten, reversiblen Schritt wird der Ligand angelagert und im zweiten, irreversiblen Schritt korrekt arretiert und von der Bindungstasche eingeschlossen.^{22, 25} Es konnte gezeigt werden, dass das Tetrazyklin bindende Aptamer vor allem Tetrazyklin mit hoher Affinität bindet, dessen Derivate wie z. B. Doxycyclin jedoch nicht.¹⁹

2.1.2.1.1 Genregulation durch das Tetrazyklin bindende Aptamer

Das Tetrazyklin bindende Aptamer wurde zur Regulation der Genexpression eingesetzt. So wurde es z. B. im 5'-UTR einer für GFP codierenden Hefe-mRNA direkt vor das Startcodon gesetzt. Durch die Stabilisierung der Aptamerstruktur bei Ligandbindung wirkt das Aptamer als sterisches Hindernis für das Ribosom. Tetrazyklinzugabe ermöglichte eine sechsfache Regulation, allerdings senkte bereits allein die Anwesenheit des Aptamers die GFP-Expression. Durch eine Stabilisierung des Aptamers konnte der Regulationsfaktor mit Tetrazyklin verbessert werden, das Grundexpressionslevel in Abwesenheit von Tetrazyklin sank jedoch auch. Somit konnten unterschiedliche regulatorische Fenster eingestellt werden.²⁷

Das Aptamer wurde weiterhin kurz hinter die 5'-Kappenstruktur inseriert. Es zeigte sich, dass das Aptamer nahe des Startcodons wesentlich bessere Regulationsfaktoren zeigte als das Aptamer an der 5'-Kappe. Mit dem Aptamer nahe der 5'-Kappe wird die Rekrutierung des 43S Preinitiationskomplexes reguliert, während das Aptamer vor dem Startcodon als Blockade fungiert und die Zugänglichkeit des Startcodons für das Ribosom reguliert.²⁸

Durch die Insertion von bis zu drei Tetrazyklin bindenden Aptameren im 5'-UTR einer HefemRNA konnte in Anwesenheit von Tetrazyklin ein Regulationsfaktor von 37 für die Expressionsinhibition des regulierten Gens erreicht werden. Darauf basierend wurde eine Kassette entworfen, die Promotoren mit unterschiedlichen Expressionsstärken und die Tetrazyklin bindenden Aptamere im 5'-UTR enthält. Die Kassette kann durch PCR vor jedes beliebige Hefegen gesetzt werden. Dieses System hat den Vorteil, dass keine zusätzlichen Proteine, die zu Interferenzen in der Zelle führen könnten, für die Regulation benötigt werden.²⁹

Durch die Insertion des Tetrazyklin bindenden Aptamers in den 3'-UTR einer mRNA konnte keine Translationsregulation erreicht werden.²⁹

2.1.2.2 Theophyllin bindendes Aptamer

Theophyllin ist ein Wirkstoff zur Asthma- und Bronchitisbehandlung. Da das Medikament eine enge therapeutische Breite hat, wird dessen Serumlevel überwacht.³⁰ Um Theophyllin in Serumproben selektiv und diskriminierend gegen chemisch nah verwandte Stoffe wie Koffein nachweisen zu können, wurde mittels SELEX ein Theophyllin bindendes Aptamer gefunden.³¹ Die Sekundärstruktur des Aptamers ist in Abbildung 2-4 dargestellt.

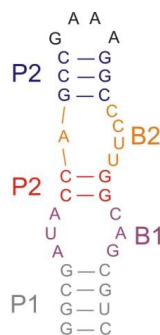


Abbildung 2-4: Sekundärstruktur des Theophyllin bindenden Aptamers.

Das Aptamer bildet eine Stammschleifenstruktur mit zwei internen Schleifen (B1 in lila und B2 in orange) aus. P steht für Stamm, B für interne Schleife.

Das Theophyllin bindende Aptamer bildet eine Stammschleifenstruktur mit zwei internen Schleifen aus. Hier sind vor allem der rechte Teil der internen, asymmetrischen Schleife sowie die untere, interne, symmetrische Schleife für die Bindung des Liganden wichtig.³¹ Durch die Bindung von Magnesiumionen nimmt das Aptamer eine aktive Konformation ein, die in der Lage ist Theophyllin zu binden. Durch die darauf folgende Ligandbindung wird die Struktur des Aptamers stabilisiert.³² Ein Theophyllinmolekül wird mit einer Dissoziationskonstante von 0,3 μM in Anwesenheit von Magnesiumionen von einem

Aptamer gebunden.^{31, 32} Andere chemisch verwandte Liganden werden wesentlich schlechter gebunden. Das strukturell verwandte Koffein wird z. B. mit einer 10000-fach höheren Dissoziationskonstante von 3,5 mM gebunden.³¹

2.1.2.2.1 Genregulation durch das Theophyllin bindende Aptamer

Wie bereits für das Tetrazyklin bindende Aptamer beschrieben, wurde auch das Theophyllin bindende Aptamer im 5'-UTR einer mRNA zur Translationsregulation z. B. in Weizenkeimextrakt eingesetzt. Die beste Regulation wurde durch die Insertion von drei aufeinander folgenden Aptameren erreicht.³³

Durch Helixverschiebungen konnte über das Theophyllin bindende Aptamer die Zugänglichkeit der Ribosomenbindestelle reguliert werden. Hier wurde durch rationelles Design das Aptamers mit einem Kommunikationsmodul fusioniert und unmittelbar neben der Shine-Dalgarno Sequenz inseriert. Es wurde eine achtfache Translationsregulation in *Bacillus subtilis* erreicht. Die Ligandbindung induziert eine Verschiebung innerhalb der Helices, sodass die Nukleotide direkt neben der Ribosomenbindestelle zugänglich werden und die mRNA translatiert werden kann.³⁴

Ein weiterer Ansatz war die Regulation der RNA-Interferenz. Hier wurde das Theophyllin bindende Aptamer mit der Schleifenregion einer shRNA fusioniert, sodass die Dicer-Schnittstelle in Abhängigkeit von Theophyllin unzugänglich war und die RNA-Interferenz inhibiert werden konnte.³⁵

Das Theophyllin bindende Aptamer wurde auch zur Transkriptionsregulation verwendet. Hierzu wurde das Aptamer als Transkriptionsterminationssignal eingesetzt. Es wurde mit einer zum Aptamer komplementären Sequenz und einer PolyU-Sequenz fusioniert. In Abwesenheit des Liganden bildet die komplementäre Sequenz mit dem Aptamer einen Transkriptionsterminator, der durch die Bindung von Theophyllin aufgelöst wird, da sich dann die Aptamerstruktur ausbildet und die Transkription ermöglicht. In bakteriellen Testsystemen konnte eine bis zu sechsfache Expressionssteigerung in Anwesenheit von Theophyllin beobachtet werden.³⁶

2.1.2.3 TetR bindendes Aptamer

2.1.2.3.1 TetR

Der Tet Repressor (TetR) ist ein bakterielles Protein, welches die Expression der Tetrazyklin-Resistenzgene kontrolliert.³⁷ Die Tetrazyklinresistenzdeterminante setzt sich aus den Genen *tetR* und *tetA* zusammen. Die beiden Gene sind divergent angeordnet und die beiden Promotoren werden über Operatorsequenzen kontrolliert.³⁸ Das *tetA*-Gen codiert für ein Membranprotein mit 12 Transmembranhelices, welches Tetrazyklin aktiv aus der Zelle transportiert.^{37, 38} *TetR* codiert für das 23 kDa schwere Regulatorprotein TetR.³⁷ Die

Einleitung

Expression von *tetA* und *tetR* wird über TetR stringent reguliert, da die Expression von *tetA* für die Zellen toxisch ist.³⁹ TetR bindet als Dimer mit je einem *helix-turn-helix*-Motiv und einer Assoziationskonstanten von $2 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1}$ an die Operatorsequenzen.³⁸

Das Antibiotikum Tetrazyklin kann durch Diffusion in die Zellen gelangen und bindet mit einer Assoziationskonstante von $3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ an TetR. Es induziert eine Konformationsänderung, die TetR von der Operatorregion ablöst und so die Genexpression ermöglicht.^{38, 40}

Basierend auf dem TetR-Regulationsmechanismus wurden konditionale Genexpressionssysteme etabliert. Für die Anwendung in eukaryotischen Systemen wurde TetR mit der Transkriptionsaktivator-domäne von VP16 aus dem Herpes Simplex Virus verknüpft. Ein durch diesen Tet-Aktivator induzierbarer Promotor wurde durch die Fusion der Operatorsequenz *tetO* mit dem viralen CMV-Promotor erreicht. Die Expression des dahinter liegenden Gens kann nun in Abhängigkeit von Tetrazyklin in Säugetierzellen an- und ausgeschaltet werden. Dieses Expressionssystem wird Tet-Off System genannt, da die Genexpression durch Doxycyclin ausgeschaltet wird.⁴¹ Das System ist in Abbildung 2-5 dargestellt.

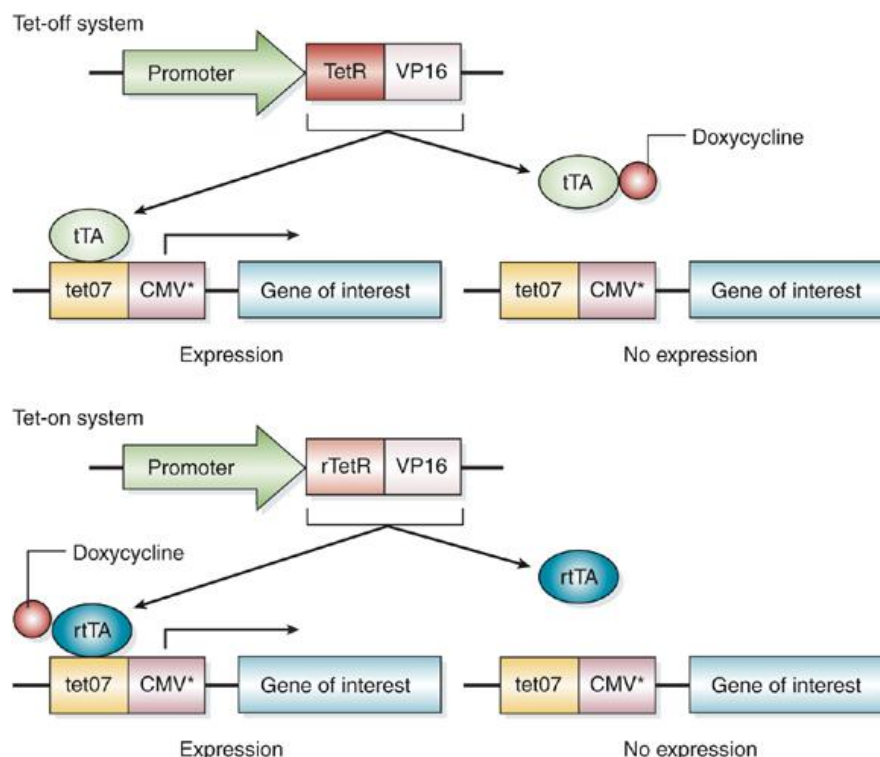


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung des Tet-Expressionssystems.

Oben: Darstellung des Tet-off Systems, was in Anwesenheit von Doxycyclin keine Expression aufweist. Unten: Darstellung des Tet-on Systems mit dem reversen Tet-Aktivator, was in Anwesenheit von Doxycyclin Expression ermöglicht. Entnommen aus Kohan⁴².

Des Weiteren existiert eine andere reverse Variante von TetR, die in Anwesenheit von Tetrazyklin an die Operator DNA bindet und sich in Abwesenheit ablöst. Dieser reverse TetR unterscheidet sich durch fünf Mutationen in der Aminosäuresequenz von TetR, wobei zwei Aminosäuremutationen für die Konversion zum reversen Phänotyp ausreichen.⁴³ Wird der reverse TetR mit der oben beschriebenen Transkriptionsaktivatorodomäne genutzt, kann die Genexpression durch Doxycyclin eingeschaltet werden, weshalb dieses Expressionssystem Tet-On genannt wird.

2.1.2.3.2 Charakterisierung des TetR bindenden Aptamers

Durch SELEX konnte eine Bibliothek an TetR bindenden Aptameren angereichert werden. Diese wurde zusätzlich durch ein *in vivo* Auswahlverfahren in *E. coli* auf Aptamere analysiert, die auch innerhalb der Zelle an TetR binden. Gefunden wurde eine in Abbildung 2-6 dargestellte 49 nt lange minimale Sequenz, die in Abhängigkeit von Tetrazyklin in der Lage ist, an TetR zu binden.⁴⁴



Abbildung 2-6: Sekundärstruktur des TetR bindenden Aptamers. Das Aptamer verfügt über zwei Stämme P1 (grau) und P2 (rot) und eine interne Schleife B1 (lila).

Für die Bindung von TetR ist vor allem die interne Schleife B1 des Aptamers zuständig; diese toleriert kaum Mutationen.⁴⁴ Es konnte eine Dissoziationskonstante von 30 nM für die Bindung von TetR an das Aptamer bestimmt werden.⁴⁴ Ein RNA-Aptamer wird dabei von einem TetR-Dimer gebunden. Das Aptamer bindet innerhalb der DNA-Bindeköpfe an TetR und ist in der Lage, mit dem Komplex aus TetR und seiner Operatorsequenz zu kompetetieren. Die Aptamerbindetasche von TetR wird unter Anderem durch die Aminosäuren 27, 47 und 48 ausgebildet.⁴⁵ Die Bindetasche ist in Abbildung 2-7 dargestellt.

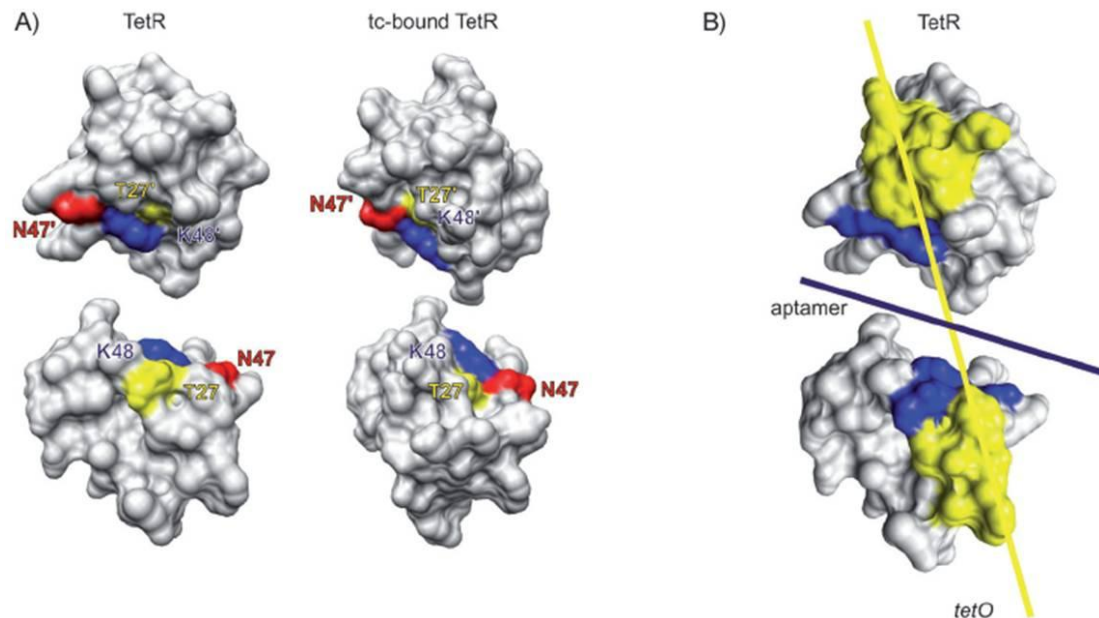


Abbildung 2-7: Darstellung der DNA-Bindeköpfe von TetR.

A: Darstellung der TetR-Bindeköpfe mit eingezeichneter Aptamer Bindetasche in Ab- (TetR) und Anwesenheit von Tetrazyklin (tc-bound TetR). Aminosäure 27 ist in gelb, 47 in rot und 48 in blau dargestellt. B: Darstellung der Binderegionen des Aptamers (blau) und der DNA Operatorsequenz tetO (gelb) auf den TetR DNA-Bindeköpfen. Entnommen aus Steber *et. al.*⁴⁵.

Es ist aus Abbildung 2-7 ersichtlich, dass die Bindetasche für das Aptamer durch die von Tetrazyklin induzierte Konformationsänderung von TetR zerstört wird. Die DNA-Bindeköpfe verschieben sich so gegeneinander, dass das Aptamer nicht mehr zwischen dem TetR-Dimer binden kann. Durch die Bindung von Tetrazyklin an TetR kann demnach das Aptamer von TetR abgelöst werden. Die Bindestelle für das Aptamer und die *tetO*-Sequenz auf TetR überlappen und somit ist keine gleichzeitige Bindung von DNA und RNA-Aptamer an TetR möglich ist.⁴⁵

2.1.2.3.3 Genregulation durch das TetR bindende Aptamer

Das TetR bindende Aptamer wurde zur konditionalen Regulation der Genexpression eingesetzt. Die Transkription von Genen, die über eine *tetO*-Operatorsequenz verfügen, konnte durch die zusätzlich Expression des TetR bindenden Aptamers reguliert werden. Hier bindet TetR bevorzugt an das Aptamer. Die Bindung an die DNA wird somit inhibiert und das Reportergen wird exprimiert. Durch Tetrazyklinzugabe kann das Aptamer von TetR gelöst werden. Durch die Stabilisierung der Aptamerstruktur konnte eine bessere Regulationsaktivität erreicht werden.⁴⁴ Dies konnte in *E. coli* und HEK293T-Zellen gezeigt werden.^{44, 46}

In einem alternativen Ansatz wurde das Aptamer kurz vor der Ribosomenbindestelle im 5'-UTR einer *E. coli*-mRNA integriert, um durch die Bindung von TetR an das Aptamer den Zugang zur Ribosomenbindestelle zu regulieren. Durch die Zugabe von Tetrazyklin konnte die Expression des Reportergens induziert werden. Allerdings konnte bei Zugabe von Tetrazyklin nicht das Expressionslevel der unregulierten Kontrolle ohne TetR erreicht

werden.⁴⁷ Der gleiche Ansatz wurde auch in Eukaryoten verfolgt. Hier wurde das TetR bindende Aptamer erfolgreich zur Translationsregulation in den 5'-UTR eine Hefe-mRNA eingesetzt. Des weiteren wurde die Translation durch ein Aptamer im 5'-UTR einer eukaryotischen mRNA im Lysat von Hasenretikulozyten reguliert.⁴⁸ Die Lokalisation von mRNAs konnte auch durch das TetR bindende Aptamer reguliert werden. Hier wurde in Hefe ein Fusionsprotein aus TetR und einem Protein exprimiert, welches RNA in Hefeknospen exportieren kann. Über dieses Fusionsprotein konnte die Lokalisation einer mRNA mit TetR bindendem Aptamer im 5'- bzw. im 3'-UTR gesteuert werden.⁴⁹

Durch die Fusion des TetR bindenden Aptamers über eine Verbindungssequenz mit dem Theophyllin bindenden Aptamer über den Stamm P2 konnte das TetR basierte Expressionssystem verfeinert werden. Nur in Anwesenheit von Theophyllin kann dieses Konstrukt eine Struktur ausbilden, die es dem TetR Aptamer ermöglicht TetR zu binden und so dessen Wechselwirkung mit der *tetO*-Operatorsequenz zu inhibieren. Die Bindungsaffinität dieses Fusionsaptamers zu TetR war allerdings schlechter als die des TetR bindenden Aptamers alleine.⁴⁶

2.1.3 Ribozyme

Ribozyme sind strukturierte RNA Moleküle, die in der Lage sind, sich mit einem der RNase A ähnlichen katalytischen Mechanismus selbst zu spalten. Es gibt eine Reihe natürlich vorkommender Ribozyme. Hierzu zählen z. B. das *hammerhead*, hairpin und Hepatitis Delta Virus (HDV) und Varkud satellite (VS) Ribozym sowie der glmS Riboswitch.⁵⁰ Die selbstspaltenden Strukturen dienen z. B. zur Abspaltung von einzelnen, viralen Genomen während der rollenden-Zirkel Replikation (*rolling-circle*) der Viroide.⁵¹

Die Ribozyme katalysieren eine interne Transphosphorylierungsreaktion, die nur ablaufen kann, wenn die zu spaltenden Nukleotide in einer Linie zueinander liegen. Das benachbarte 2'-OH greift die eigene 3'-Phosphatgruppe nukleophil an und es entsteht ein pentakovalenter Übergangszustand mit einem zyklischen Phosphat, was noch mit dem benachbarten Nukleotid verbunden ist. Im nächsten Schritt wird das 5'-OH-Ende entlassen und es entsteht ein zyklisches 2'3'-Phosphat am 3'-Ende.⁵¹ Der Mechanismus ist in Abbildung 2-8 dargestellt.

Einleitung

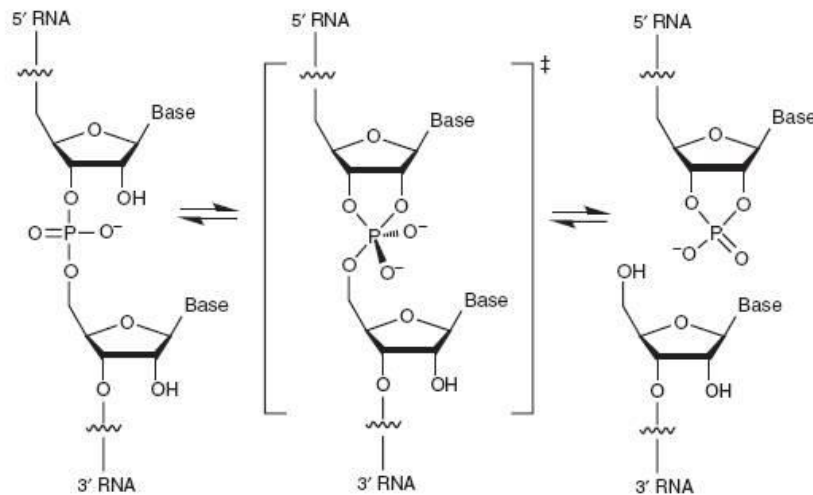


Abbildung 2-8: Spaltmechanismus der Ribozyme.

Im ersten Schritt greift die 2'-OH-Gruppe die 3'-Phosphatgruppe nukleophil an und es kommt zu einem Übergangszustand mit zyklischem Phosphat (in Klammern). Im letzten Schritt wird der Übergangszustand zu einem zyklischen 2'3'-Phosphat und einer 5'-OH-Gruppe aufgelöst. Entnommen aus Ferré-D'Amaré und Scott⁵¹.

Die 2'-OH-Gruppe wird durch eine Base und die 5'-OH-Abgangsgruppe durch eine Säure aktiviert. In der RNase A werden Aminosäuren als Basen und Säuren verwendet, während in den Ribozymen Nukleotide genutzt werden. Die von der negativ geladenen RNA gebundenen Kationen, welche als Lewis-Säure wirken können, erleichtern die Abspaltung von Hydroxidgruppen und unterstützen so die Katalyse. Die Linienkonformation der Basen wird hier durch Wasserstoffbrücken und Stapelinteraktionen stabilisiert, wobei sich die Strukturen der einzelnen Ribozyme unterscheiden.^{50, 51}

Das *hammerhead* Ribozym besteht aus drei helicalen Stämmen, die in einem hoch konservierten Mittelteil aus 11 Nukleotiden aufeinandertreffen und eine γ -förmige Struktur ausbilden. Die Spaltung erfolgt zwischen Stamm P1 und P3 am Cytosin C₁₇. Es ist in Abbildung 2-9 dargestellt.⁵⁰

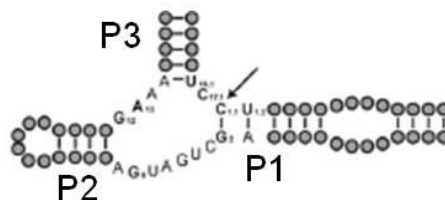


Abbildung 2-9: Schematische Darstellung des *hammerhead* Ribozyms.

P1 bis P3 bezeichnet die Stämme und der Pfeil markiert die Spaltstelle. Modifiziert nach Cochrane und Strobel⁵⁰.

Die Säure-Base-Katalyse wird im *hammerhead* Ribozym durch Wasserstoffbrücken innerhalb des flexiblen Mittelteils erreicht. Das konservierte G₁₂ gegenüber der Spaltstelle bildet eine Wasserstoffbrücken zur nukleophil angreifenden 2'-OH Gruppe. Des Weiteren bindet das 2'-OH von G₈, welches zwischen P1 und P2 liegt, eine Wasserstoffbrücke zur 5'-Abgangsgruppe.⁵¹ Die Spaltung des *hammerhead* Ribozym erfolgt unabhängig von einem Liganden.

Der *glmS* Riboswitch ist in vielen Gram-positiven Bakterien an der Regulation der Genexpression des GlmS Enzyms beteiligt, welches Glucosamin-6-phosphat produziert. Der Riboswitch wird durch Glucosamin-6-phosphat aktiviert und inhibiert so bei steigenden Glucosamin-6-phosphat-Konzentrationen die Genexpression. In Abwesenheit des Liganden findet jedoch kaum Spaltung statt. Mit Hilfe von *in-line probing* konnte gezeigt werden, dass der *glmS* Riboswitch auch nach dem in Abbildung 2-8 dargestellten Mechanismus arbeitet und die spontane Spaltung um ein 1000-faches beschleunigt.⁸

Das erste synthetische Ribozym, dessen Spaltaktivität durch einen niedermolekularen Liganden kontrolliert werden konnte, wurde 1997 von Tang *et al.*⁵² entwickelt. Hierzu wurde das ATP bindende Aptamer mit dem *hammerhead* Ribozym fusioniert und die Spaltung so von der Zugabe des Liganden abhängig gemacht.⁵²

2.1.3.1 Theophyllin abhängiges hammerhead Ribozym

Das Theophyllin bindende Aptamer wurde bereits zur Regulation des *hammerhead* Ribozyms eingesetzt. Das Aptamer wurde über eine Modulationssequenz mit dem Stamm P2 des Ribozym verbunden, sodass diese Sequenz durch Basenpaarung im Ribozym die Spaltung inhibiert, sobald Theophyllin an das Aptamer bindet (Ausschalter). Alternativ wurde die Modulationssequenz so gewählt, dass sie die Ribozymsspaltung nur erlaubt, wenn Theophyllin an das Aptamer gebunden ist (Einschalter). Durch die Insertion dieses Schalters in den 3'-UTR einer mRNA konnte eine ca. 20-fache Regulation eines Reportergens in Hefe erreicht werden.⁵³

Die Universalität dieses Ansatzes wurde durch den Austausch des Theophyllin bindenden Aptamers gegen das Tetrazyklin bindende Aptamer und den erfolgreichen Einsatz dieser beiden Strukturen in Säugetierzellen gezeigt.⁵⁴

In einem weiteren Design wurde das Theophyllin bindende Aptamer mit dem Stamm P3 des *hammerhead* Ribozyms fusioniert und im 5'-UTR einer bakteriellen mRNA inseriert. Der Stamm P1 des Ribozyms wurde verlängert und dort die Shine-Dalgarno-Sequenz bzw. auf dem Gegenstrang eine Anti-Shine-Dalgarno-Sequenz eingefügt. Durch die Bindung von Theophyllin an das Aptamer wurde die Spaltung des Ribozyms induziert und dadurch die Ribozymstruktur so zerschnitten, dass die Shine-Dalgarno-Sequenz wieder zugänglich wurde.⁵⁵ Dieser Schalter wurde weiterentwickelt und konnte erfolgreich im 5'-UTR einer mRNA in humanen Zellen zur Genexpressionsregulation genutzt werden. Durch Theophyllinzugabe wurde das Ribozym aktiviert und spaltete die 5'-Kappenstruktur der mRNA ab, was im Abbau der RNA resultierte. Die Fusionssequenz zwischen dem Stamm P3 und dem Aptamer musste optimiert werden, um eine fünffache Regulation in humanen Zellen zu erreichen. Demnach war das Theophyllin abhängige Ribozym hier nur bedingt zwischen den unterschiedlichen Domänen des Lebens austauschbar.⁵⁶

2.2 Spleißen

Die prä-mRNAs eukaryotischer Gene bestehen aus codierenden Exons und nicht codierenden Introns. Durch das Spleißen, werden die Introns entfernt und es entsteht die fertige mRNA, die ins Cytosol exportiert und translatiert werden kann. Die Definition eines Introns erfolgt durch kurze, konservierte Sequenzen, wie die 5'-Spleißstelle, die 3'-Spleißstelle und der Verzweigungspunkt (*branch point*). Der Verzweigungspunkt liegt 18-40 nt *downstream* der 3'-Spleißstelle und in höheren Eukaryoten folgt auf den Verzweigungspunkt eine Polypyrimidinsequenz.⁵⁷ Der schematische Aufbau eines Introns ist in Abbildung 2-10 gezeigt.



Abbildung 2-10: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Introns.

Die beiden Exons werden durch ein Intron getrennt (grau), welches eine 5'-Spleißstelle (5' splice site) eine Verzweigungspunkt (branch site) und eine 3'-Spleißstelle (3' splice site) beinhaltet. In Metazoen folgt eine Polypyrimidinsequenz (Poly Y tract) auf die Verzweigungspunkt. Entnommen aus Will und Lührmann⁵⁷.

2.2.1 Spleißmechanismus

Der Spleißprozess wird vom Spleißosom katalysiert, einem Ribonukleoproteinkomplex, welcher die Entfernung der Introns durch zwei Umesterungsreaktionen katalysiert. Im ersten Schritt greift die 2' OH-Gruppe des Adenosins der Verzweigungspunkt nukleophil die 5'-Spleißstelle an. Hierdurch wird das 5'-Ende des Introns an die Verzweigungspunkt ligiert und ein Lariatstruktur ausgebildet. Im nächsten Schritt wird die 3'-Spleißstelle von der 3'-OH-Gruppe des 5'-Exons angegriffen, was zur Ligation des 5'- und 3'-Exons führt, während das Intron als Lariatstruktur entlassen wird.⁵⁷ Diese Reaktion ist in Abbildung 2-11 gezeigt.

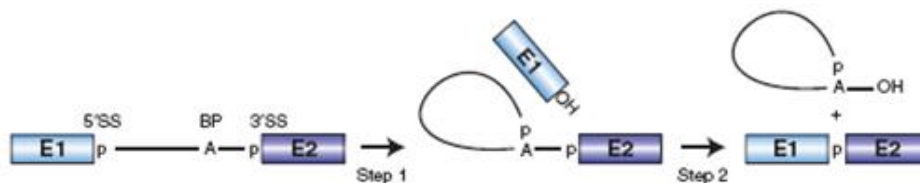


Abbildung 2-11: Darstellung der beiden Schritte der Umesterungsreaktionen zur Entfernung des Introns.

Im ersten Schritt (Step 1) greift die 2'-OH-Gruppe des Adenosins der Verzweigungspunkt (BP) die 5'-Spleißstelle (5' SS) an, wodurch eine Lariatstruktur entsteht. Im zweiten Schritt (Step 2) wird die 3'-Spleißstelle (3' SS) von der 3'-OH-Gruppe des 5'-Exons (E1) angegriffen und an das 3'-Exon (E2) ligiert, während das Intron als Lariatstruktur entlassen wird. Entnommen aus Will und Lührmann⁵⁷.

Viele in *trans* arbeitende Faktoren binden an die prä-mRNA und formen das Spleißosom. Das Intron wird von den snRNPs U1, U2, U5 und U4/U6 und einigen non-snRNP Proteinen gebunden. Jedes snRNP besteht aus einer snRNA und sieben Sm Proteinen und einer variierenden Anzahl an für den jeweiligen snRNP spezifischen Proteinen. Die Zusammenlagerung des Spleißosoms erfolgt durch die Interaktion der snRNPs und vielen anderen Spleißfaktoren. Bei einem Intron kleiner als 200-250 nt lagert sich das Spleißosom

am Intron zusammen. Im ersten Schritt bindet das U1 snRNP über Basenpaarungen an die 5'-Spleißstelle und nicht-snRNPs wie SF1/mBBP und U2AF wechselwirken mit der Verzweigungspunkt und der Polypyrimidinsequenz. Im nächsten Schritt bindet snRNP U2 an die Verzweigungspunkt und formt den A-Komplex (Präspleißosom). Dann wird der vorassemblierte tri-snRNP aus U4/U6 und U5 rekrutiert und der B-Komplex entsteht. Umlagerungen führen zur Destabilisation von snRNPs U1 und U4 und der aktive B-Komplex entsteht. Durch die Anlagerung der DEAH-box Helikase Prp2 entsteht der B*-Komplex, der den ersten Schritt des Spleißens katalysiert. Durch Umlagerungen innerhalb des Komplexes wird der C-Komplex gebildet, welcher den zweiten Schritt des Spleißens katalysiert. Das Spleißosom benutzt ein einziges aktives Zentrum für beide katalytischen Schritte, folglich muss das Spleißosom in zwei unterschiedlichen Konformationen vorliegen. Der Wechsel zwischen diesen beiden Konformationen scheint jedoch aus mehreren Phasen und Umstrukturierungen zu bestehen. Danach dissoziiert das Spleißosom.⁵⁷ Dieser Zyklus des Spleißens ist Abbildung 2-12 schematisch dargestellt.

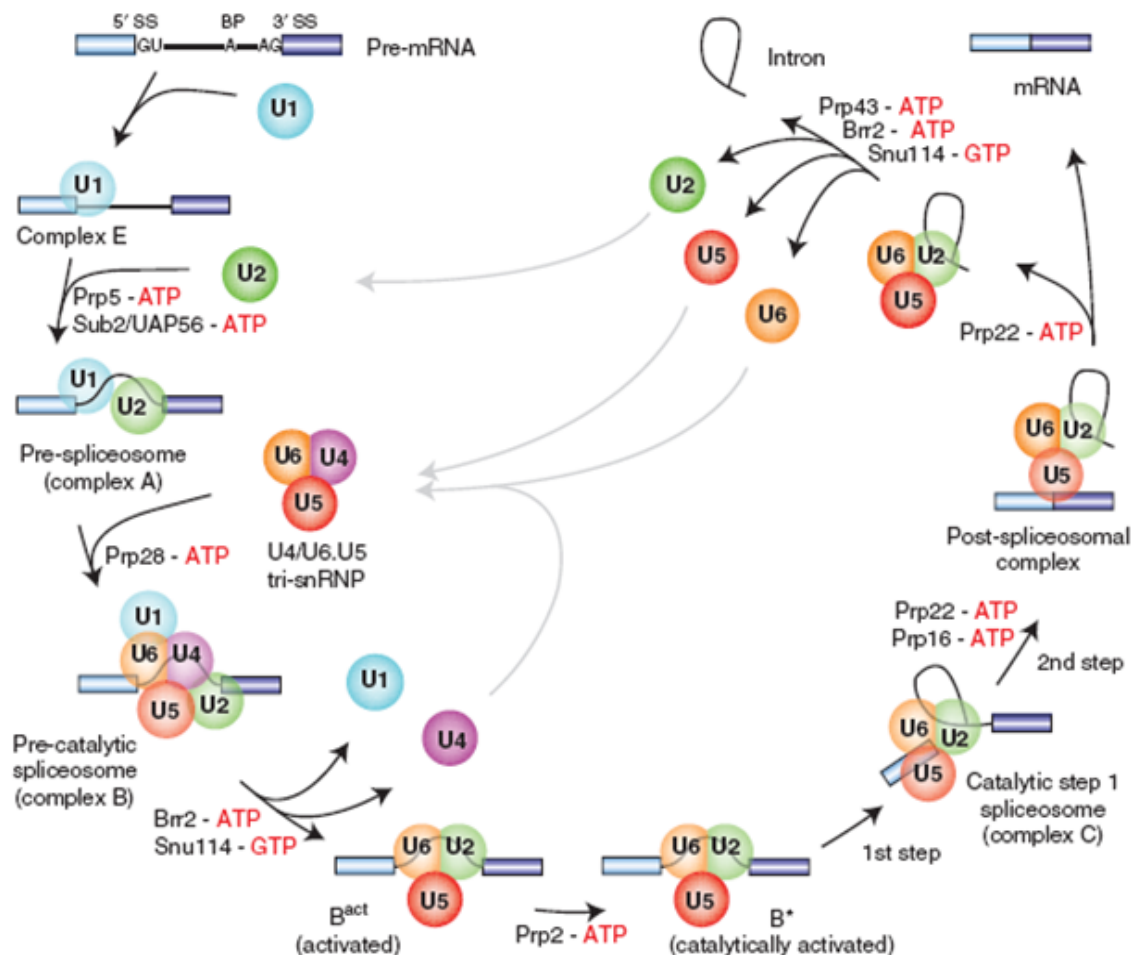


Abbildung 2-12: Darstellung der Zusammenlagerung des Spleißosoms. snRNPs sind als Kreise dargestellt. Für detailliertere Beschreibungen siehe Text. Entnommen aus Will und Lührmann⁵⁷.

Viele prä-mRNAs in Säugetierzellen enthalten mehrere Introns mit unterschiedlicher Größe (mehrere Hundert bis mehrere Tausend nt), während die Exons im Durchschnitt 120 nt lang sind. Wenn die Introns größer als 250 nt sind, was bei höheren Eukaryoten meist der Fall ist, bildet sich der Spleißkomplex entlang eines Exons. Hierbei wird von der Exon-Definition gesprochen. SnRNP U1 bindet dann an die 5'-Spleißstelle *downstream* des Exons und fördert die Anlagerung von U2AF an die 3'-Spleißstelle *upstream* davon. Danach wird snRNP U2 an den Verzweigungspunkt *upstream* des Exons rekrutiert. Die *splicing enhancer* Sequenzen innerhalb der Exons rekrutiert SR Proteine, welche Proteinwechselwirkungen entlang des Exons ausbilden und so den exondefinierenden Komplex stabilisieren (Abbildung 2-13). Da die eigentliche Spleißreaktion über ein Intron verläuft, muss der Exondefinitions-komplex in einem noch unbekannten Schritt in den Intron übergreifenden A-Komplex überführt werden.⁵⁷

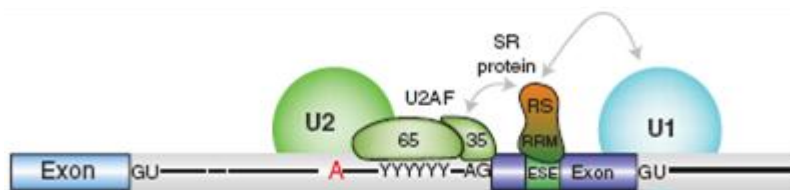


Abbildung 2-13: Darstellung der Anlagerung der Spleißosomproteine zur Exon-Definition. SnRNP U1 bindet an die 5'-Spleißstelle *downstream* des Exons und fördert die Anlagerung von U2AF an die 3'-Spleißstelle *upstream* davon. Danach wird snRNP U2 an den Verzweigungspunkt (rotes A) *upstream* des Exons rekrutiert und die *splicing enhancer* Sequenz (ESE) innerhalb des Exons rekrutiert SR Proteine, welche Proteinwechselwirkungen entlang des Exons ausbilden. Entnommen aus Will und Lührmann⁵⁷.

Mit dem Spleißosom assoziieren viele Proteine, die regulatorische Funktionen beim Spleißen haben oder auch die Kopplung des Spleißens mit anderen molekularen Maschinerien im Zellkern, wie z. B. der Transkription und der Polyadenylierung, steuern. Das große Repertoire an Spleißosom assoziierten Proteinen ermöglicht der Spleißosommaschinerie eine hohe Flexibilität, um auf verschiedenen Anforderungen von einzelnen mRNAs und auch Veränderungen im zellulären Umfeld einzugehen. Teilweise werden die Umlagerungen der RNPs durch postrtranslationale Modifikationen gefördert.⁵⁷

2.2.2 Alternatives Spleißen

Ein durchschnittliches menschliches Gen enthält 8 bis 9 Introns und mehr als 80% der humanen Gene werden alternativ gespleißt.⁵⁸ Dies erfolgt kotranskriptionell und kann dramatische Auswirkungen auf das Protein haben. So können z. B. Membranproteine löslich werden oder der Leserahmen verschoben werden.^{58, 59} Die Möglichkeiten des alternativen Spleißens sind in Abbildung 2-14 dargestellt.

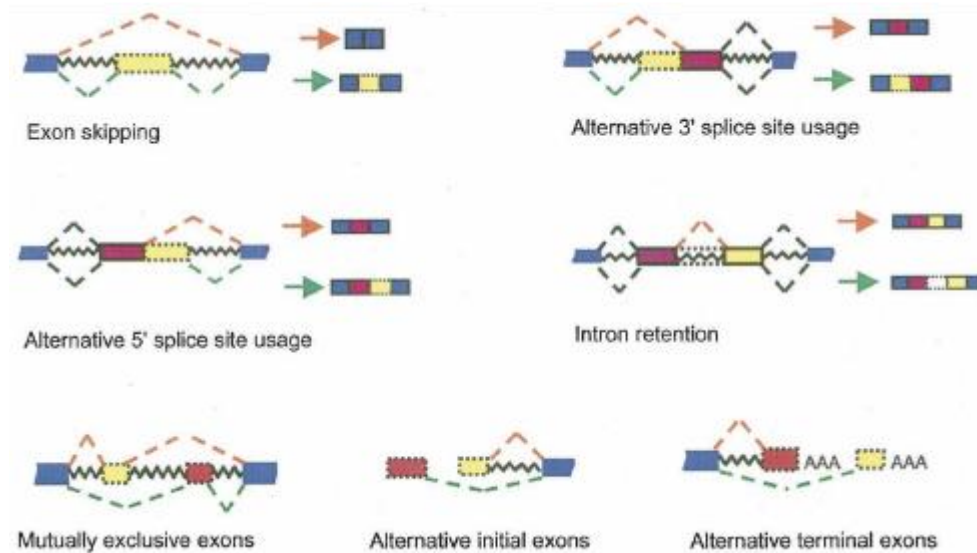


Abbildung 2-14: Darstellung der alternativen Spleißformen.
Für detaillierte Informationen siehe Test. Entnommen aus Wang und Burge⁵⁹.

Ein Drittel aller alternativen Spleißvorgänge erfolgt über sogenannte Kassettenexons (*exon skipping*). Hier wird ein Exon inkludiert oder heraus gespleißt, je nachdem, ob die umgebenden Introns einzeln (Exoninklusion; grün in Abbildung 2-14) oder zusammen mit dem Kassettenexon gespleißt werden (Exonexklusion; orange in Abbildung 2-14).⁶⁰

Eine weitere Variante ist die Nutzung von alternativen 3'- oder 5'-Spleißstellen innerhalb eines Exons, was in unterschiedlichen Exonlänge resultiert. Des Weiteren kann ein Intron in der gespleißten mRNA verbleiben (*intron retention*) oder variierend Exons eingefügt werden (*mutually exclusive exons*). Das 5'- bzw. 3'-Ende einer mRNA kann durch die Wahl von alternativen, initialen oder terminalen Exons variiert werden.

Gesteuert wird das alternative Spleißen durch *silencer* und *enhancer* Elemente. Diese Elemente können im Exon vorliegen (*exonic splice enhancer*, ESE bzw. *exonic splice silencer*, ESS) und fördern bzw. hemmen die Inklusion des Exons. Alternativ können diese Elemente auch im Intron liegen (*intronic splice enhancer*, ISE bzw. *intronic splice silencer*, ISS) und die Benutzung der benachbarten Spleißstellen fördern oder hemmen. All diese Elemente funktionieren durch die Rekrutierung von in *trans* arbeitenden Faktoren. So kommen ESEs oft in konstitutiven Exons vor und fördern dort das Anlagern von SR-Proteinen, wie z. B. ASF, welche wiederum die Anlagerung des Spleißosoms durch ihre arginin- und serinreichen Domänen fördern und Kontakte mit dem Verzweigungspunkt und der 5'-Spleißstelle ausbilden. Die *silencer* Elemente rekrutieren hnRNP Proteine mit glycinreichen Domänen, die z. B. die Bindung von snRNPs oder die Ausbildung essentieller Interaktionen innerhalb des Spleißosoms verhindern.^{58, 59} Die Wirkung der Spleißelemente ist schematisch in Abbildung 2-15 dargestellt.

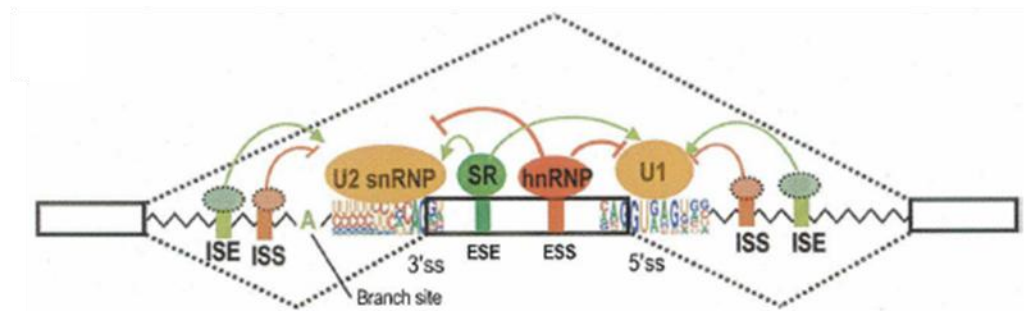


Abbildung 2-15: Schematische Darstellung der Wirkung der regulatorischen Spleißelemente. Die *exonic splice enhancer* (ESE) und - *silencer* (ESS) fördern bzw. hemmen die Inklusion des Exons. Die *intrinsic splice enhancer* (ISE) und -*silencer* (ISS) fördern bzw. hemmen die Nutzung der benachbarten Spleißstellen. Entnommen aus Wang und Burge⁵⁹.

Die *splice enhancer* im Intron bestehen z. B. aus einem G-Triplett oder einer längeren Folge von Guanosinen, welche die Erkennung der benachbarten Spleißstelle fördern. Werden diese Elemente ins Exon verlegt, wirken sie hemmend auf den Spleißvorgang.⁵⁹ Die hemmenden Elemente im Intron bestehen z. B. aus CA reichen Regionen und rekrutieren hnRNP L bzw. hnRNP A1, welche die Nutzung der benachbarten Spleißstellen und *enhancer* Sequenzen behindern. Oft liegen mehrere Elemente in räumlicher Nähe und wirken additiv.^{58, 59} Das Spleißverhalten kann auch durch Sekundärstrukturen der mRNA beeinflusst werden. Stammschleifenstrukturen nahe der 5'-Spleißstelle von Exon 10 im humanen *tau* Gen regulieren die Zugängigkeit der Spleißstelle und senken durch Stabilisation der Struktur die Exoninklusionsrate.⁵⁹

Fehler des Spleißprozesses können zu Krankheiten führen. So sind 50% der genetisch bedingten Krankheiten auf Spleißfehler zurückzuführen.⁵⁸ Alzheimer und Mukoviszidose werden durch Mutationen in Spleißstellen verursacht. Mutationen können auch zur Ausbildung neuer Spleißstellen führen und so das Spleißmuster verändern. Bei der Hutchinson-Gilford-Progerie, die mit beschleunigtem Altern, Wachstumsschädigung und einer verkürzten Lebenserwartung einhergeht, wird durch eine Mutation eine kryptische Spleißstelle innerhalb eines Exons eingeführt, was zu einer verkürzten Proteinform führt. In Krebszellen ist das alternative Spleißen vieler Gene gestört. STAT3 ist ein Transkriptionsfaktor und kann je nach Inklusion oder Exklusion eines bestimmten Exons als Onkogen oder Tumorsuppressor wirken.⁶¹

Eine Therapiemöglichkeit solcher Krankheiten besteht in der Anwendung von *antisense* Oligonukleotiden. Bei der Duchenne Muskeldystrophie werden Muskeln abgebaut, was letztendlich durch den Abbau der Herz- und Atemmuskulatur zum Tod führt. Diese Krankheit wird durch eine Mutation hervorgerufen, welche ein vorzeitiges Stoppcodon innerhalb des Exons 51 einführt. Bindet ein *antisense* Oligonukleotid an dieses Exon, werden die Spleißstellen nicht mehr erkannt und es kommt zur Exonexklusion und damit zur Entfernung des vorzeitigen Stoppcodons.⁶¹

2.2.3 Spleißregulation durch RNA-Schalter

Der Thiaminpyrophosphat (TPP)-Riboswitch wurde zuerst in Bakterien gefunden, existiert aber auch in Eukaryoten und reguliert dort alternatives Spleißen.⁵ Thiamin wird in die Zellen aufgenommen und dort zu TPP phosphoryliert und bindet dann als Ligand an den TPP-Riboswitch. Dieser wurde im Schimmelpilz *Neurospora crassa* charakterisiert. Hier wird die Expression von Genen, die am Thiaminmetabolismus beteiligt sind, in Anwesenheit von TPP ausgeschaltet. Der Riboswitch liegt in einem Intron und basenpaart mit einer alternativen 5'-Spleißstelle bzw. mit einer Region in der Nähe von alternativen Spleißstellen. Durch diese Basenpaarung mit dem Riboswitch sind die alternativen Spleißstellen nicht zugänglich und eine weiter entfernte Spleißstelle am Rand des Introns wird verwendet. Wird nun TPP gebunden, faltet sich der Riboswitch um und die alternativen Spleißstellen werden zugänglich und zum Spleißen genutzt. Dadurch entsteht z. B. beim *nmt1*-Gen eine mRNA, die einen uORF enthält, welcher mit dem eigentlichen Leserahmen um die Translationsmaschinerie konkurriert und so die Enzymmenge senkt.¹¹ In einem weiteren Mechanismus bringt der TPP-Riboswitch durch eine Basenpaarung über weite Distanz die 3'- und 5'-Spleißstelle für den Hauptleserahmen in räumliche Nähe und fördert so die Genexpression in Abwesenheit von TPP. Bei Bindung von TPP wird diese Basenpaarung aufgehoben und die Nutzung von alternativen Spleißstellen gefördert.⁶²

Beim TPP-Riboswitch handelt es sich somit um einen natürlichen Spleißregulator. Es wurden jedoch auch artifizielle RNA-Schalter zur Steuerung des Spleißens z. B. in Hefe entwickelt. Hier wurde das Tetrazyklin bindende Aptamer *downstream* der 5'-Spleißstelle in ein Intron eingefügt. Durch die Stabilisation der Aptamerstruktur bei Ligandbindung kann die Zugänglichkeit der Spleißstelle beeinflusst werden. Über zwei Aptamer-kontrollierte Introns konnte hier ein maximaler Regulationsfaktor von 32 erreicht werden.⁶³

Auch in humanen HEK293-Zellen konnte der Spleißprozess durch ein Aptamer reguliert werden. Hierzu wurden proteinbindende Aptamere in ein Intron inseriert, die durch sterische Hinderung bei Ligandbindung die Zugänglichkeit der Spleißstelle steuerten. Dadurch konnte die Exklusion eines Kassettenexons, welches ein Stoppcodon enthält, reguliert werden. Es wurden z. B. Aptamere verwendet, welche die Untereinheiten von NFκB binden und dadurch die Expression der Kinase des Herpes Simplex Virus (HSV) regulieren. Wird die HSV-Kinase exprimiert, werden die Zellen sensitiv für Ganciclovir, welches dann Apoptose induziert. Bei diesem Ansatz konnte die Überlebensrate der Zellen von 60 - 90% in Anwesenheit von Ganciclovir auf 20% durch die Induktion der NFκB Produktion gesenkt werden durch die Exklusion eines Exons mit Stoppcodon.⁶⁴

Diese Beispiele zeigen, dass die Regulation des Spleißprozesses sowohl durch natürliche als auch durch synthetische Riboswitches erreicht werden kann.

2.3 Viren

Viren sind infektiöse Partikel, welche sich extrazellulär verbreiten und innerhalb eines Wirts vermehren. Sie sind nicht in der Lage, sich selbständig ohne Wirtszelle zu vermehren und verursachen meist Krankheitserscheinungen im Wirt, da sie dessen zelluläre Systeme für ihre eigene Replikation nutzen und dabei in den meisten Fällen die wirtseigene Proteinbiosynthese inhibieren.

Viren können sowohl DNA- als auch RNA-Genome besitzen. Im Rahmen dieser Arbeit wird jedoch nur auf die RNA-Viren näher eingegangen.

2.3.1 RNA-Viren

RNA-Viren verfügen über ein RNA-Genom. Da Zellen keine RNA-abhängige RNA-Polymerase besitzen, müssen diese Viren andere Wege zur Replikation finden. Einige codieren selbst für RNA-abhängige RNA-Polymerasen, die sie für ihre Genomsynthese und Transkription nutzen. Die Retroviren dagegen nutzen die reverse Transkription, um ihr Genom in DNA umzuschreiben und es dann in das Wirtsgenom zu integrieren und zusammen mit den wirtseigenen Genen exprimieren zu lassen.⁶⁵

RNA-Viren werden nach ihrem Replikationszyklus und Genom in verschiedene Gruppen eingeteilt:⁶⁵

Die erste Gruppe verfügt über ein doppelsträngiges RNA-Genom und besteht aus acht Familien, zu denen z. B. die Rotaviren gehören. Hier wird der Minusstrang der RNA als Matrize für die Transkription durch eine viral codierte RNA-abhängige RNA-Polymerase genutzt.⁶⁵

Die zweite Gruppe benutzt ein Negativstrang RNA-Genom. Hierzu gehört z. B. die Familie der *Rhabdoviridae*, welche den Tollwutvirus beinhaltet. Der Virus codiert selbst für eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, welche das Virusgenom in einzelne mRNAs umschreibt. Die RNA-Polymerase synthetisiert zusätzlich einen zum Virusgenom komplementären Plusstrang, welcher als Matrize für die Synthese von neuem Virusgenom dient.⁶⁵

Die Gruppe der Retroviren verfügt über ein Plusstrang-RNA-Genom, welches durch die viruseigene reverse Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben wird. Die DNA wird dann von der Wirtszelle zusammen mit den wirtseigenen Genen transkribiert und translatiert.⁶⁵

Eine weitere Gruppe verfügt über ein einzelsträngiges Plusstrang-RNA-Genom, welches direkt von der Wirtszelle translatiert werden kann. Für die Replikation wird eine viruseigene RNA-abhängige RNA-Polymerase eingesetzt, die einen zum Genom komplementären Minusstrang als Matrize für die Synthese neuer genomischer RNA nutzt. Diese Gruppe beinhaltet 27 Familien, unter anderen auch die Alphaviren, dessen Vertreter, der Semliki Forest Virus, im Folgenden näher vorgestellt werden soll.⁶⁵ Die Einteilung in die Familien

erfolgt nach Anzahl, Größe, Lage und Orientierung der Virusgene auf dem RNA-Genom und nach dem Vorhandensein einer Hüllmembran.

2.3.1.1 Semliki Forest Virus

Semliki Forest Virus (SFV) verfügt über ein Plusstrang-RNA-Genom und gehört zu den am besten untersuchten Vertretern der Alphaviren, da es sich leicht in Zellkultur vermehren lässt. Es tritt in Afrika, Indien und Südostasien auf und wird durch die Gelbfiebermücke (*Aedes aegypti*) und die asiatische Tigermücke (*Aedes albopictus*) unter anderem auf Nagetiere übertragen.⁶⁶

SFV repliziert gut in Mosquitozellen und führt dort zu einer dauerhaften, lebenslangen Infektion der Mosquitos, die jedoch kaum krankhafte Erscheinungen haben. Nach wenigen Tagen Inkubationszeit kann der Stich des Mosquitos Vertebraten infizieren. Die Viren vermehren sich anfangs vor allem in den Endothelzellen und lymphatischen Zellen. Das führt meist zu kurzen Infektionen, die in den Wirtszellen zytotoxische Effekte und Apoptose induzieren. Über das Blut werden die Viren dann zu weiteren Zielorganen transportiert bzw. durch das geschädigte Endothel in das Nervensystem eingeschleust. SFV repliziert in vielen Körperzellen und induziert dort Apoptose. Eine Ausnahme stellen die Nervenzellen dar. Hier wird eine anhaltende Infektion etabliert, weshalb die Infektion von Nagetieren durch SFV oft zu einer Encephalitis führt.^{66, 67}

Alphaviren replizieren in vielen unterschiedlichen Körperzellen und verfügen demnach über ein breites Spektrum an Wirtszellen. Sie binden an verschiedene Rezeptoren auf den Zellen.⁶⁷ Für SFV wurde unter anderem gezeigt, dass er an den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) auf humanen und murinen Zellen bindet.⁶⁸

2.3.1.1.1 Aufbau

SFV verfügt über ein ikosaedrisches Nukleocapsid und eine Doppellipidschicht als Hüllmembran, in welche die Glykoproteine E1 und E2 eingelagert sind.^{66, 67} Die Struktur des Virus ist in Abbildung 2-16 dargestellt.

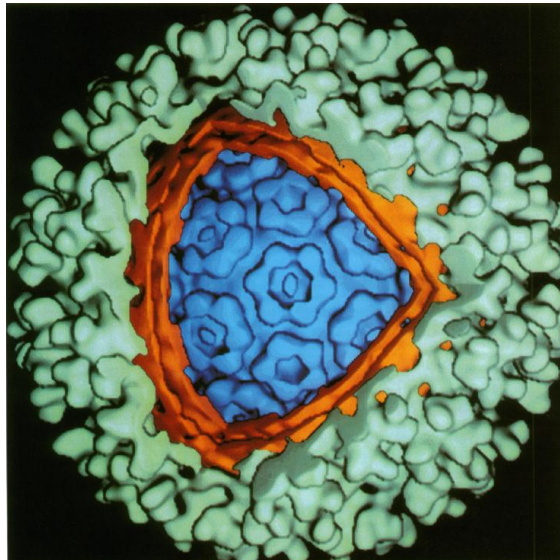


Abbildung 2-16: Aufgeschnittenes Alphavirus. Das Nukleocapsid ist in blau dargestellt und von einer Lipiddoppelschicht als Hüllmembran (orange) umgeben. In die Hüllmembran sind die Glykoproteine eingelagert (grün). Entnommen aus Strauss und Strauss⁶⁷.

Im Nukleocapsid ist das Plusstrang RNA-Genom über elektrostatische Wechselwirkungen an den N-Terminus der stark geladenen Capsidproteine gebunden. Die gebundene RNA neutralisiert die Ladung der Capsidproteine und ermöglicht so erst die Zusammenlagerung der Capsidproteinen zu einem Nukleocapsid. Die virale RNA enthält ein Verpackungssignal, was bei der Assemblierung des Nukleocapsids zur Einlagerung der viralen RNA führt. Durch die fenestrierte Struktur des Capsids ist die RNA auch innerhalb des Capsids für RNasen zugänglich.⁶⁷

Die Hüllmembran des Virus entstand aus der Membran der Wirtszelle und enthält die Glykoproteine E1 und E2. E1 und E2 bilden Heterodimere, die sich zu trimeren Proteinkomplexen zusammenlagern und wovon ca. 80 Stück pro Virionenhülle gefunden werden können.^{66, 67}

Das Genom von Alphaviren ähnelt in seinem Aufbau einer mRNA und verfügt über eine 5'-Kappenstruktur, einen 5'- und einen 3'-UTR, die Sekundärstrukturen aufweisen können und einen PolyA-Schwanz. Es ist in Abbildung 2-17 schematisch dargestellt.^{66, 67}

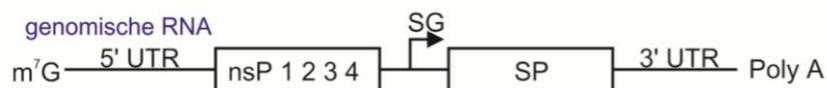


Abbildung 2-17: Schematische Darstellung des Genomaufbaus von SFV. Das Genom enthält eine 5'-Kappenstruktur (m⁷G), einen 5'- und einen 3'-UTR und einen PolyA-Schwanz (Poly A). Des Weiteren codiert es für zwei offene Leserahmen (durch Kästen angedeutet), die für die Nicht-Strukturproteine (nsP 1 – 4) und die Strukturproteine (SP) codieren. Zwischen den beiden Leserahmen liegt der subgenomische Promotor (SG).

Alphaviren codieren für zwei offene Leserahmen. Der erste codiert für die Nicht-Strukturproteine (nSP) eins bis vier und der zweite für die Strukturproteine (SP). Als nSP werden diejenigen Proteine bezeichnet, die enzymatisch die Replikation des Virus unterstützen. nSP1 weist eine Methyltransferase und Guanylyltransferase-Aktivität auf und ist an der Bildung der 5'-Kappenstruktur der viralen RNA beteiligt. Der N-Terminus von nSP2 weist eine Helikaseaktivität auf, die für die Transkription und Genomreplikation wichtig ist. Der C-Terminus besitzt dagegen eine Proteinaseaktivität und prozessiert das nSP-Polyprotein. Die Funktion von nSP3 ist noch nicht genau bekannt, es wird jedoch für die Genomreplikation benötigt. nSP4 ist die RNA-abhängige RNA-Polymerase des Virus.⁶⁷

Innerhalb der nSP liegt der subgenomische Promotor, welcher für die Synthese der subgenomischen mRNA genutzt wird. Diese codiert für die Strukturproteine, welche aus dem Capsidprotein, welches das Nukleocapsid bildet, und den Glykoproteinen E1 und E2 bestehen.^{66, 67}

2.3.1.1.2 Replikationszyklus

Der Replikationszyklus von SFV beginnt mit der Aufnahme des Virus durch Endocytose in mit Clathrin überzogene Vesikel. Der Transfer zu Endosomen durch die Erniedrigung des pH-Wertes führt zu Konformationsänderungen in den E1-E2 Heterodimeren. Hierbei wird die Virusmembran mit der Endosomenmembran fusioniert und das Nukleocapsid gelangt ins Cytosol. SFV repliziert ausschließlich im Cytosol der Wirtszelle.^{66, 67}

Die Freisetzung des viralen Genoms ermöglicht die Translation der viralen Proteine durch wirtseigene Ribosomen. Die Nicht-Strukturproteine werden als Polyprotein translatiert und durch nSP2 in die Proteine nSP1, nSP2, nSP3 und nSP4 prozessiert (Abbildung 2-18 A).⁶⁷

Eine schematische Übersicht über die Replikation des Virus ist in Abbildung 2-18 dargestellt.

Einleitung

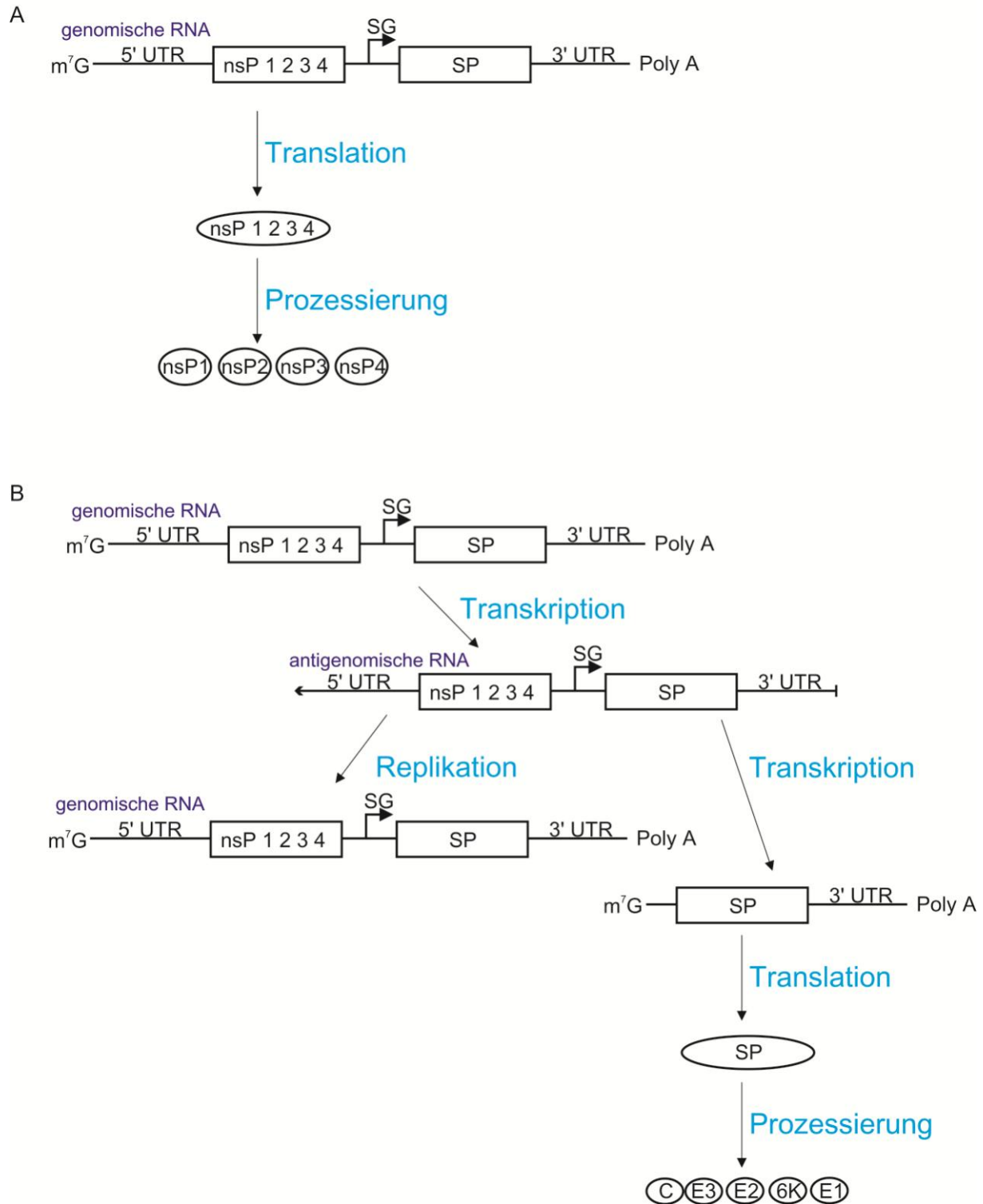


Abbildung 2-18: Schematischer Überblick über den Replikationszyklus von SFV.

A: Die nSP werden direkt vom viralen Genom als Polyprotein translatiert. B: Das virale Genom wird zur Synthese eines Minusstrang Antigenoms genutzt, welches unter anderem zur Replikation dient. Zusätzlich dient das Antigenom als Matrize für die Synthese der subgenomischen mRNA über den subgenomischen Promotor (Pfeil mit SG), welche als Polyprotein translatiert wird.

Eine konserviertes Strukturelement am 3'-Ende des Plusstrang-Genoms wird als Promotor für die Synthese des Antigenoms genutzt. Dieses Antigenom wiederum dient als Matrize zur Synthese von neuem viralen Plusstrang-Genom. Hierzu wird eine konservierte Region am

3'-Ende der Minusstrang RNA als Promotor für die RNA-Synthese durch die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase nSP4 verwendet.⁶⁷

Des Weiteren verfügt der entstandene Minusstrang über den subgenomischen Promotor, welcher die Synthese der subgenomischen mRNA durch die virale Polymerase nSP4 ermöglicht (Abbildung 2-18 B). Diese subgenomische mRNA weist eine Größe von 26S auf und wird deshalb auch 26S mRNA genannt. Die Strukturproteine werden von der 26S mRNA als Polyprotein translatiert. N-terminal der Strukturproteine liegt das Capsidprotein, welche das Nukleocapsid bilden. Dieses besitzt eine Serin-Protease-Aktivität und kann sich so selbst aus der naszierenden Polypeptidkette freischneiden. Die C-terminal des Capsidproteins synthetisierten Glykoproteine E1 und E2 werden durch eine N-terminale Signalsequenz am endoplasmatischen Retikulum translatiert. Durch das hydrophobe 6K-Protein, welches zwischen E1 und E2 codiert wird, werden die Glykoproteine in die Plasmamembran der Wirtszelle eingelagert.⁶⁷

Liegen ausreichende Mengen an Capsidprotein vor, assoziiert dieses zum Nukleocapsid und bindet an die virale, genomische RNA, wodurch die Translation der viralen RNA verhindert und somit die Synthese weiterer nSP unterbrochen wird.⁶⁶ Die zum Nukleocapsid zusammengelagerten Capsidproteine diffundieren frei im Cytosol und binden an die Glykoproteine in der Plasmamembran, woraufhin behüllte Viren von der Plasmamembran des Wirts abgeschnürt werden.⁶⁷

Die Inhibition der wirtseigenen Proteinsynthese setzt abrupt ca. 3 h nach Infektion ein. Danach ist die Proteinsynthese größtenteils virusspezifisch. Dies wird über vier Mechanismen erklärt. Die mRNAs der Wirtszelle konkurrieren mit den viralen RNAs um die Translationsmaschinerie und die Veränderung der intrazellulären Umgebung begünstigt die Translation der viralen mRNA. Die direkte Inhibition der wirtseigenen Proteinsynthese durch das virale Capsidprotein und die Wechselwirkung der nSP mit den Initiationsfaktoren der Wirtszelle tragen zusätzlich zur Inhibition der wirtseigenen Proteinsynthese bei.⁶⁷

2.3.1.1.3 SFV als Expressionssystem

SFV kann für die Expression heterologer Gene genutzt werden. Hierzu klonierten Liljenström und Garoff⁶⁹ die cDNA von SFV hinter einen SP6 Promotor. Der Leserahmen für die SP wurde entfernt und auf einem Helferplasmid eingefügt, welcher kein Verpackungssignal enthält, da die nSP nicht vorhanden sind. Statt der nSP kann ein Reportergen eingefügt werden. Der verbliebene Vektor mit den minimalen Genen für die Replikation von SFV wird Replikon genannt.

Zur Herstellung von sogenannten replikationsdefizienten viralen Replikonpartikel (VRP) über das Replikon wurden die viralen RNAs *in vitro* transkribiert und in Zellen elektroporiert, die dann die VRP herstellen und das Virusgenom mit dem Reportergen darin verpacken. Diese VRP können weitere Zellen infizieren, darin replizieren und das Reportergen exprimieren. Da

sie jedoch nicht für die Strukturproteine codieren, können sie keine neuen Viren synthetisieren.⁶⁹

Zum Testen der heterologen Genexpression wurde die für Lysozym codierende Gensequenz hinter den subgenomischen Promotor eingesetzt und die Überexpression des heterologen Gens über Gelelektrophorese nachgewiesen.⁶⁹ Mittlerweile kann jedes beliebige Gen hinter den subgenomischen Promotor im Replikon kloniert werden.

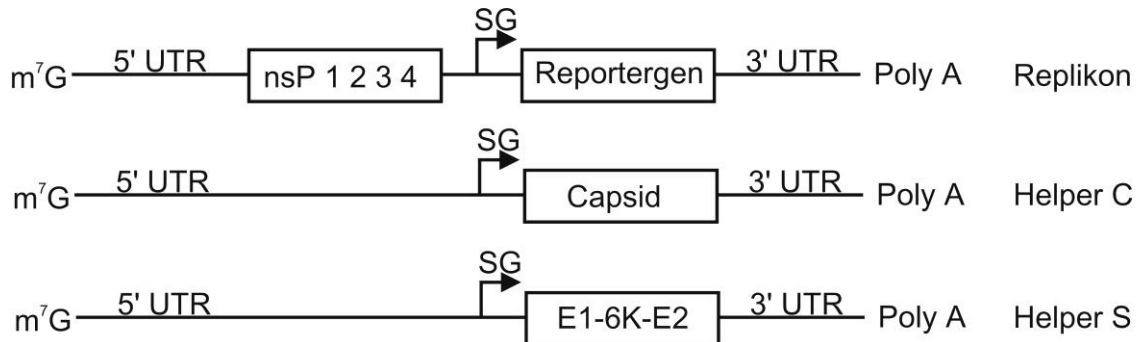


Abbildung 2-19: Schematische Darstellung des gesplitteten Helfersystems (*split helper*).

Das System besteht aus drei RNAs, zum einen die Replikon-RNA, welche für die nSP und das Reportergen codiert. Die Strukturproteine wurden auf zwei RNAs aufgeteilt, wobei eine für das Capsid codiert (Helper C) und die anderen für die Glykoproteine (*Spikes*; Helper S).

Um das Risiko einer Rekombination zwischen der Helfer-RNA und dem Replikon zurück zum Wildtypvirus zu verhindern, wurde das Helferplasmid geteilt (*split helper system*). Die in diesem System transfizierten RNAs sind in Abbildung 2-19 dargestellt.

Für das gesplittete Helfersystem wurden die Gene für die SP auf zwei Vektoren aufgeteilt. Der Helfervektor C (*helper C*) trägt das Gen für das Capsidprotein hinter dem subgenomischen Promotor und der Helfervektor S (*helper S*) codiert für die Glykoproteine, welche die *spikes* auf der Virushülle bilden. Für die Herstellung der VRPs werden nun alle drei viralen RNAs in Zellen elektroporiert. Alternativ können auch Zellen, die stabil die viralen SP exprimieren, verwendet werden. Hier ist der erreichte Titer an VRP jedoch niedriger als bei der Elektroporation von drei RNAs.⁷⁰ Zur weiteren Verbesserung der Translationseffizienz kann der Beginn des Capsidgens *in frame* vor das Reportergen gesetzt werden, da hier ein Translationsenhancer enthalten ist.⁷⁰ Bei der heterologen Expression von Proteinen durch SFV handelt es sich um eine transiente Expression der Reportergene, da SFV in den Wirtszellen zytotoxische Effekte verursacht und letztendlich Apoptose induziert.⁶⁹⁻⁷¹ Die Apoptose verläuft über den p53 unabhängigen Weg und wird durch nSP2 induziert.⁷¹ Um den zytotoxischen Effekt zu minimieren, wurde eine Screening durchgeführt, bei dem zwei Punktmutationen in nSP2 gefunden wurden, die einen nicht zytotoxischen Phänotyp zeigten. Die eine Mutation P718T liegt innerhalb von nSP2 und die zweite R649H innerhalb des Kernlokalisationssignals. Es zeigte sich, dass diese mutierten SFV-Varianten 125-fach schwächer replizierten als der Wildtypvirus und auch schlechter verpackt wurden. Bei Infektion mit dieser Mutante überlebten die Zellen allerdings die Infektion.⁷² Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine weitere Mutation in nSP2, R65D, den zytotoxischen Effekt

von SFV absenkt, die Replikation und Verpackung des Virus aber kaum beeinflusst. Um jedoch einen avirulenten Stamm zu erhalten, sind noch zusätzliche Mutationen im nSP4 nötig.⁷³

Weitere Möglichkeiten zur Expression von fremden Genen durch SFV bestehen in der Insertion von Reportergenen zwischen nSP3 und 4. Es zeigte sich, dass sich diese VRP ähnlich wie der Wildtypvirus verhalten, aber langsamer replizieren.⁷⁴ Eine Alternative ist die Insertion eines zusätzlichen subgenomischen Promotors zusammen mit dem Reportergen in den 3'-UTR des SFV-Genoms. Hier konnte eine erfolgreiche Replikation und Verpackung der Viren beobachtet werden, obwohl das Genom durch das zusätzliche Gen vergrößert wurde. Des Weiteren wurde nach dem minimalen subgenomischen Promotor gesucht. Rausalu *et al.*⁷⁵ konnten zeigen, dass die beste Expression mit dem Promotor in seiner vollen Länge erreicht wurde. Eine Kürzung des Promotors verschlechterte die Expression bzw. eine Kürzung auf 21 nt *upstream* des Transkriptionsstarts und 5 nt *downstream* zeigte keinerlei Expression mehr. Es konnte gezeigt werden, dass mindestens 26 nt *upstream* und 20 nt *downstream* des Transkriptionsstartes verwendet werden sollten, um eine akzeptable Expressionsstärke des dahinter codierten Gens zu erreichen.⁷⁵

2.3.1.2 Medizinische Relevanz von Alphaviren

Alphaviren besitzen einen natürlichen Tropismus für Tumorzellen und replizieren bevorzugt in diesen. Viele Tumorzellen haben eine veränderte IFN-I Antwort, was die Replikation von Alphaviren erleichtert. Zusätzlich ruft SFV im Menschen kaum Krankheitssymptome hervor, bzw. wurden durch Mutationen avirulente Stämme erzeugt, was SFV zu einem potentiellen onkolytischen Virus macht. Tatsächlich konnte in SCID-Mäusen eine Regression von humanen, subkutan implementierten Melanomen durch eine Alphavirusinfektion gezeigt werden. Allerdings entwickelten die Tiere neuropathische Symptome, da sie über kein Immunsystem verfügen. Bei Nagetieren mit Immunsystem war der Antitumoreffekt schwächer.⁷⁰

SFV, welcher IFN α exprimiert, konnte erfolgreich das Tumorstadium in Mäusen mit eingesetzten Lungenkrebstumoren und Adenocarcinomen inhibieren und sogar zur Rückbildung der Tumore beitragen.⁷⁶

Um die Tumorspezifität von SFV weiter zu erhöhen, könnte das veränderte microRNA (miRNA) Expressionsprofil von Tumorzellen genutzt werden. So konnte bereits erfolgreich eine miRNA-Zielsequenz in SFV eingebracht werden. Gesunde Zellen, welche die miRNA exprimieren, inhibieren so die Virusreplikation.⁷⁷

Des Weiteren werden Alphaviren für Impfungen gegen Krebs getestet.^{70, 73} Es zeigte sich, dass die RNA von Alphaviren 100 bis 1000-fach effizienteren Tumorschutz bietet als konventionelle Plasmide, wenn z. B. ein Melanomantigen durch einen Alphavirus exprimiert

wird. Dies ist darauf zurück zu führen, dass die Viren zusätzlich in der Wirtszelle Apoptose induzieren und so die vom Virus eingebrachten Antigene von dendritischen und antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen und präsentiert werden.⁷⁰

So zeigten Mäuse, die zuvor mit einem Tumor spezifische Antigene exprimierendem SFV infiziert wurden, Schutz gegen den entsprechenden Tumor. Ein Großteil der Brustkrebsmodellmäuse war vor der spontanen Entwicklung von Brustkrebstumoren geschützt, nachdem sie mit SFV infiziert wurden, der die Tyrosinkinase HER/neu überexprimiert. Diese Tyrosinkinase wird in 20 bis 30% der Brustkrebstumore überexprimiert. Dies wurde auch mit Melanomen und Mastocytomen mit den entsprechenden Antigenen gezeigt.⁷⁰

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Infektion von SFV durch Induktion von Apoptose und Nekrose zur Regression von bestehenden Lungenkarzinomen führen kann, wenn die Mäuse mehrmals infiziert werden. Dieser Effekt konnte dadurch verstärkt werden, dass SFV z. B. das proapoptotische Protein Bax oder IL-12 exprimiert. In Murmeltiermodellen, die spontan Leberzellkarzinome entwickelten, konnte eine Reduktion des Tumorumfanges von 80% durch die Infektion mit IL-12 exprimierendem SFV erzielt werden. Ähnliche Effekte konnten auch mit IL-15 und IL-18 exprimierenden Alphaviren gezeigt werden.⁷⁰ SFV, der Untereinheiten von IL-12 exprimiert, wird bereits in Phase I der klinischen Studien zur Behandlung von Melanomen und Nierenkarzinomen getestet.⁷³

Die Expression von Suizidgenen durch Alphaviren zeigte eine Regression des Tumorstadiums in humanen Eierstocktumoren in SCID-Mäusen. Hier wurde z. B. die Thymidinkinase von Herpes Simplex Virus Typ 1 verwendet, welche die Sensitivität gegen Nukleosidanaloge wie Ganciclovir erhöht und so den Zelltod auslöst.⁷⁸

Alphaviren werden auch für die Impfstoffproduktion getestet. Hier exprimieren sie Antigene von anderen Viren und aktivieren so das Immunsystem. So befinden sich z. B. Alphaviren, die Antigene des Cytomegalovirus oder des Influenzavirus exprimiert in klinischen Studien der Phase I. Des Weiteren wird ein gag exprimierender Alphavirus als Impfstoff gegen HIV getestet.⁷³

Alphaviren werden wegen ihrer starken Präferenz für neuronale Zellen auch zur Behandlung von Krankheiten des zentralen Nervensystems untersucht. Hier wurde z. B. SFV für die Behandlung von experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis genutzt, was eine der multiplen Sklerose ähnliche Erkrankung des zentralen Nervensystems von Labortieren ist. Durch die Infektion mit dem Wildtyp SFV wurde die Krankheit verschlimmert, durch Infektion mit einem avirulenten SFV-Stamm, welcher IL-10 exprimiert, konnte die Krankheit jedoch abgeschwächt werden.⁷³

2.3.1.3 Regulation von Viren mittels RNA-Schaltern

Zur Regulation von RNA-Viren, die ohne DNA-Zwischenprodukt replizieren, können etablierte konditionale Systeme auf Transkriptionsebene, wie z. B. das Tet-System, nicht genutzt werden. Eine Möglichkeit stellen hier Regulationssysteme auf RNA-Ebene dar. Hierzu gibt es bereits Beispiele in der Literatur:

So wurde ein RNA-Aptamer genutzt, welches an das gD-Protein von Herpes Simplex Virus Typ 1 bindet. Dieses Protein ist an der Wechselwirkung mit den Rezeptoren auf der Wirtszelle beteiligt und somit essentiell für den Eintritt des Virus in die Zelle. Wurden Herpesviren mit dem Aptamer inkubiert und dann damit Zellen infiziert, konnte die Infektion der Zellen inhibiert werden, indem die Wechselwirkung des gD-Proteins mit den zellulären Rezeptoren durch das Aptamer blockiert wurde. Allerdings musste das Aptamer durch Fluorgruppen am 2' OH modifiziert werden, um den Abbau durch im Medium vorhandene Endonukleasen zu verhindern.⁷⁹

Des Weiteren wurde ein sich selbst schneidendes *hammerhead* Ribozym mit einem Aptamer fusioniert, welches spezifisch die stark strukturierte IRES von Hepatitis C Virus bindet. Der Hepatitis C Virus besitzt ein einzelsträngiges Plusstrang-RNA-Genom und nutzt zur Translation eine auf dem Genom codierte IRES. Nun wurde ein Aptamer eingesetzt dessen apikale Schleife mit der IRES auf dem Virusgenom wechselwirkt. Dadurch wird das fusionierte *hammerhead* Ribozym, welches spezifisch den 5'-UTR des Hepatitis C Virus schneidet, in räumliche Nähe zu seiner Zielsequenz gebracht. Es konnte gezeigt werden, dass durch Kotransfektion des Aptazymes und des Virusgenoms die Expression des auf dem Virusgenom codierten Reportergens um 70% reduziert wurde.⁸⁰

In einem weiteren Beispiel wurde ein Aptamer in das Virus integriert, um die Replikation über den Liganden des Aptamers schaltbar zu machen. Hierzu wurde das Theophyllin bindende Aptamer in den Tombusvirus *tomato bushy stunt virus* (TBSV) in die Nähe eines für die Replikation essentiellen Pseudoknoten inseriert. TBSV verfügt über ein einzelsträngiges Plusstrang-RNA-Genom, welches im 5'-UTR ein in eine komplexe Struktur gefaltetes regulatorisches Element enthält. Innerhalb dieses Elements liegt die Stammschleifenstruktur SL5, welche das T-förmige Element von dem *downstream* Element separiert. Das T-förmige Element und das *downstream* Element bilden einen Pseudoknoten aus, der für die Virusreplikation essentiell ist. Die Struktur ist in Abbildung 2-20 dargestellt.

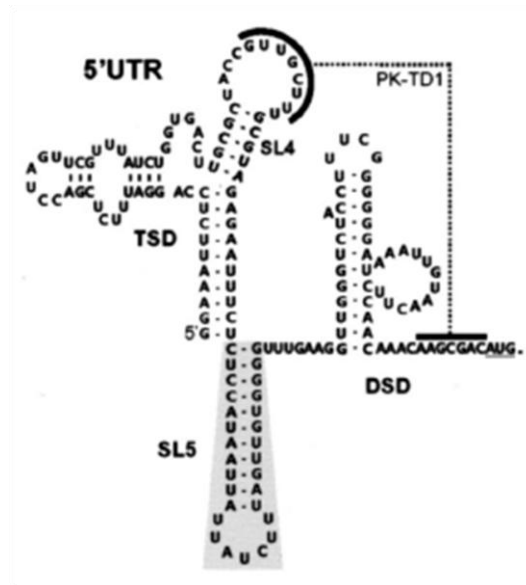


Abbildung 2-20: 2D-Struktur des Pseudoknotens innerhalb des regulatorischen Elements im 5'-UTR von TBSV.

TSD steht für T-förmige Domäne und DSD für *downstream* Domäne. Die beiden Elemente werden durch die Stamm Schleifenstruktur SL5 separiert und bilden einen Pseudoknoten (PK-TD1) aus. Entnommen aus Wang und White⁸¹.

Die SL5 wurde nun durch das Theophyllin bindende Aptamer ersetzt. In Abwesenheit des Liganden liegt das Aptamer in einer flexiblen Form vor und verhindert die Ausbildung des Pseudoknotens. Bindet jedoch Theophyllin, wird die Aptamerstruktur stabilisiert, der Pseudoknoten kann ausgebildet werden und somit die Replikation starten. Durch Zugabe von 1 mM Theophyllin konnte die Genexpression von TBSV um über 50% gesteigert werden.⁸¹

Weitere Beispiele für RNA-Schalter sind bei der Regulation des medizinisch interessanteren Adenovirus zu finden. Hier wurde die Replikation durch die Insertion des Theophyllin abhängigen *hammerhead* Ribozyms reguliert. Adenoviren werden bereits in klinischen Studien als onkolytische Viren und zum Einbringen von Genen in der Krebstherapie eingesetzt. Adenoviren verfügen über ein doppelsträngiges DNA-Genom und erzeugen während der Replikation mehrere einzelne mRNAs. Durch die Insertion des Theophyllin abhängigen *hammerheads* im 5'- und 3'-UTR eines vom Adenovirus codierten Reportergens konnte in Anwesenheit von Theophyllin die Aktivität des Reportergens auf unter 20% gesenkt werden. Hier könnte der RNA-Schalter demnach als eine Art Sicherheitssystem zum Abschalten von medizinisch genutzten Viren eingesetzt werden.⁸²

2.3.2 Retroviren

Retroviren sind RNA-Viren, die als Proviren ins Genom vieler Vertebraten integrieren können. Die Infektion mit Retroviren führt zu Krankheiten wie Krebs oder AIDS (*acquired immune deficiency syndrome*).⁸³

Einleitung

Retroviren sind umhüllte Viren mit zwei Kopien ihres Genoms auf einer Plusstrang-RNA im Capsid. Die RNA-Stränge sind 8 bis 11 kb lang, am 5'-Ende zu dimeren Strukturen verknüpft und von Nukleocapsidproteinen ummantelt.⁸³ Die Hüllproteine, welche zur Wechselwirkung mit der Wirtsmembran benötigt werden, liegen in der äußeren Lipidmembran vor.⁸³ Die Matrixproteine verankern die Lipidhülle mit dem Capsid.⁸⁴ Zusätzlich enthält das Virus virale Enzyme wie die Protease, reverse Transkriptase und Integrase.⁸⁴ Abbildung 2-21 zeigt den schematischen Aufbau eines Retrovirus.

Die meisten Retroviren können nur in das Genom von gerade proliferierenden Zellen integrieren, da das Genom während der Replikation zugänglicher ist. Lentiviren sind eine Subklasse der Retroviren, welche komplexer aufgebaut sind und auch in nicht proliferierende Wirtsgenome integrieren können. Zu den Lentiviren zählt z. B. HIV, welches AIDS auslöst. Durch ihre Eigenschaft, ins Wirtsgenom zu integrieren, sind retrovirale Vektoren für die Gentherapie einsetzbar.⁸³

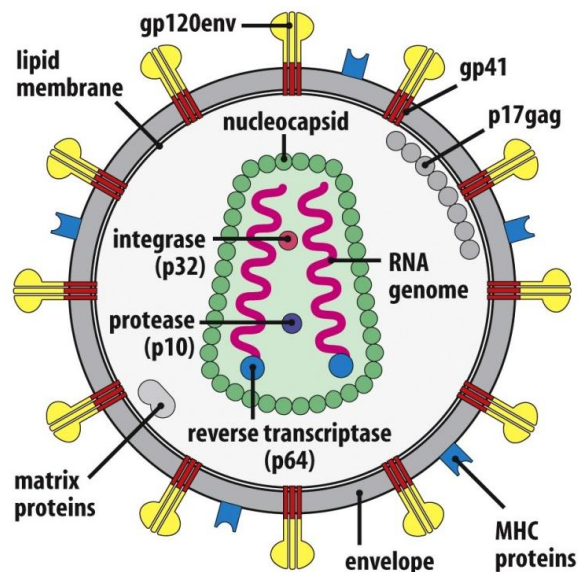


Abbildung 2-21: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Retrovirus am Beispiel von HIV. Der Retrovirus ist von einer Lipidmembran umschlossen, worin die Hüllproteine eingelagert sind. Die Matrixproteine verankern das Capsid an der Hüllmembran. Im Capsid liegen zwei RNA-Einzelstränge als Genom und virale Proteine wie die reverse Transkriptase und die Integrase vor. Entnommen aus Murphy *et al.*⁸⁴

Die virale, genomische RNA der Retroviren enthält einen untranslatierten Bereich am 5'-Ende (5'-UTR) und am 3'-Ende (3'-UTR), virale offene Leserahmen (ORF) und einen Poly-Adenin-Schwanz und ist damit für die Wirtszelle nicht von eigener mRNA unterscheidbar.⁸³

Das retrovirale Genom enthält hauptsächlich drei Genbereiche: *gag*, *pol* und *env*, welche von langen repetitiven Bereichen (*long terminal repeats*; LTR) flankiert werden. *Gag* steht für gruppenspezifisches Antigen und codiert für innere Strukturproteine, wie z. B. die Capsidproteine. *Pol* wird als Polyprotein synthetisiert und codiert für die reverse Transkriptase und weitere virale Enzyme, wie die Integrase und die Protease. *Pol* wird als Gag-Pol-Polyprotein exprimiert. Die Polyproteine werden durch die virale Protease

prozessiert. Der dritte Genbereich *env* codiert für die Hüllproteine und wird von gespleißter RNA translatiert.⁸³

Lentiviren haben zusätzliche Gene, deren Genprodukte die virale Expression auf verschiedenen Ebenen regulieren können.

2.3.3 Humane endogene Retroviren

Humane endogene Retroviren (HERV) entstanden durch die Infektion von Keimzellen mit exogenen Vorläuferretroviren. Diese wurden mit dem Wirtsgenom repliziert und vererbt.⁸⁵

Der letzte so in das menschliche Genom integrierte, humane endogene Retrovirus ist HERV-K. Die Integration erfolgte während der Aufspaltung von Neuwelt- und Altweltaffen.^{85,}

⁸⁶

Heute bestehen ca. 8% des humanen Genoms aus humanen endogenen Retroviren.⁸⁷ Die verschiedenen HERVs mit ähnlichen Sequenzen wurden in Familien gruppiert, die sich unter anderem in der tRNA, welche sie als Primer für die reverse Transkription benutzen, voneinander unterscheiden. Hierbei wird in erster Linie der Einbuchstabencode der Aminosäuren für die Benennung der Familien verwendet.^{85, 88} Die einzelnen Mitglieder einer Familien unterscheiden sich durch unterschiedliche Genomsequenzen voneinander.⁸⁸

All diese Familien haben jedoch gemeinsam, dass sie nicht mehr infektiös sind und Deletionen und Mutationen im ursprünglichen Genom beinhalten.⁸⁵ Einige HERVs bestehen beispielsweise nur noch aus den LTRs.⁸⁸ Trotzdem werden HERVs mit vielen Krankheiten, wie Schizophrenie, multipler Sklerose, Typ 1 Diabetes, rheumatoider Arthritis und vor allem Krebs in Verbindung gebracht.⁸⁸ Viele der HERVs sind mit komplexen Retroviren verwandt und verfügen somit wahrscheinlich über akzessorische, regulatorische Proteine. Da die meisten HERV-Genome jedoch durch Mutationen oder Deletionen zerstört wurden, ist es schwierig im Nachhinein Aussagen zu akzessorischen Proteinen zu treffen. Ein Beispiel für ein noch exprimiertes akzessorisches Protein ist Rec von HERV-K, das am Export ungespleißter viraler RNA beteiligt ist.⁸⁵

2.3.3.1 HERV-K

Es gibt verschiedene HERV-Familien, die sich unter anderem in der tRNA, welche sie als Primer für die reverse Transkription nutzen, unterscheiden. Hierbei wird in erster Linie der Einbuchstabencode der Aminosäuren für die Benennung der Familien verwendet. HERV-K z. B. verwendet die tRNA der Aminosäure Lysin als Primer in der reversen Transkription.⁸⁹ Die HERV-K/HML-2 Familie wird in dieser Arbeit mit HERV-K abgekürzt.

In teratogenen Hodentumoren wurden erstmals virale Partikel von HERV-K, sogenannte *human teratocarcinoma-derived virus particles* (HTDV), beobachtet. Eine elektronenmikroskopische Aufnahme von HTDVs ist in Abbildung 2-22 gezeigt. Diese Partikel sind nicht

infektiös, bleiben meist auf dem Status der Knospung stehen oder verfügen über eine eingefallene Hülle.

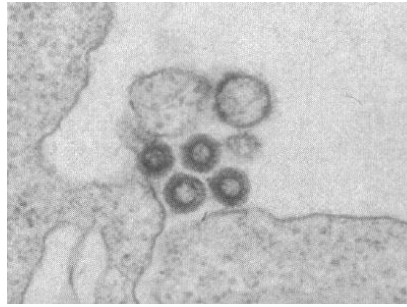


Abbildung 2-22: Elektronenmikroskopisches Bild von HTDV.
Entnommen aus Löwer et al.⁸⁵

Die offenen Leserahmen der meisten Mitglieder der HERV-K-Familie wurden ebenfalls durch Mutationen und Deletionen zerstört, jedoch verfügen noch einige Wenige über offene Leserahmen für alle viralen Gene. Es wird vermutet, dass HERV-K eine Funktion im Genom hat, da einzelnen Mitglieder dieser Familie als einzige HERVs noch mit Kopien im Genom vorliegt, die alle viralen Leserahmen enthalten. Möglicherweise schützt er die Zelle vor der Infektion durch verwandte exogene Viren.^{90, 91}

2.3.3.1.1 Aufbau von HERV-K

HERV-K codiert für die bekannten retroviralen Gene *gag*, *prt*, *pol* und *env* sowie für die akzessorische Proteine Rec oder Np9. Rec ist am Export viraler RNA beteiligt, während die Funktion von Np9 noch unbekannt ist.⁸⁸ Innerhalb von HERV-K werden zwei Typen unterschieden. Typ 1 codiert für Np9 und hat eine 292 bp lange Deletion am Übergang der Gene *pol* und *env*. Typ 2 exprimiert Rec und hat keine Deletionen⁸⁸. Rec wird von einer 1,8 kb, doppelt gespleißten *env*-mRNA translatiert und enthält das 292 bp lange Segment zwischen *pol* und *env*, was bei HERV-K Typ 1 fehlt⁹⁰.

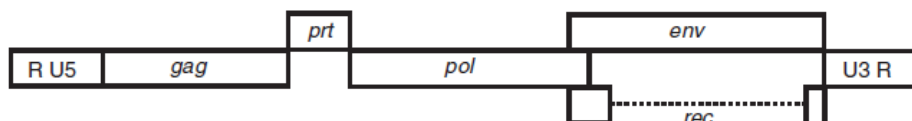


Abbildung 2-23: Schematische Darstellung des Genoms von HERV-K Typ 2.

Am 5'-Ende befinden sich das untranslatierte R- und das U5-Element gefolgt von den Genen für *gag*, *prt*, *pol* und *env*. Bei der Expression von *rec* wird der gestrichelte Teil des *env*-Gens herausgeschnitten. Am 3'-Ende befinden sich das U3- und das R-Element. Das Rec responsive Element (RcRE), woran Rec bindet, befindet sich in der U3-Region.

Entnommen aus Reynier et al.⁹²

2.3.3.1.2 Medizinische Relevanz von HERV-K

Es gibt Hinweise, dass HERV-K in die Karzinogenese involviert ist, da die Expression der Gene von HERV-K in vielen Tumorgeweben gegenüber gesunden Geweben erhöht ist. Transkripte von HERV-K konnten in Hoden- und Brustkrebszellen, Melanomen und Ovarial-Karzinomen nachgewiesen werden^{85, 88}, während in normalen gesunden Geweben eine

Expression von HERV-K nur mit sehr sensitiven Methoden beobachtet werden konnte^{85, 92}. Des Weiteren konnten Antikörper gegen HERV-K in Patienten mit Hodentumoren nachgewiesen werden, während dies bei gesunden Patienten nicht möglich war⁸⁵. Im Blut von Patienten mit Lymphomen oder Brustkrebs konnten das Genprodukt von *env* und virale teilweise unreife oder deformierte Partikel von HERV-K nachgewiesen werden, was wiederum bei Gesunden nicht der Fall war⁹³. Dies weist auf eine gesteigerte Expression von HERV-K während einer Krebserkrankung hin. Wurden die Lymphome behandelt und bildeten sich zurück, sanken auch die Transkriptionsprodukte von HERV-K unter die Nachweisgrenze⁹³.

Auch in Verbindung mit anderen Krankheiten, wie der rheumatoiden Arthritis, konnte eine Expression von HERV-K-Proteinen im Plasma von Patienten nachgewiesen werden. Hier wird vermutet, dass die Expression von HERV-K durch die krankheitsbedingte Entzündung gesteigert wird⁹².

Zurzeit ist jedoch nicht eindeutig geklärt, ob die HERV-K-Expression die Karzinogenese oder andere Krankheiten auslöst oder nur einen Begleiteffekt darstellt^{88, 94}. Stengel *et al.*⁹⁵ konnten zeigen, dass Zellen mit hoher Expression von HERV-K eine hohe Promotoraktivität aufwiesen, was eine Demethylierung des Promotors und somit des 5'-LTR benötigte. Hieraus wurde geschlossen, dass genetische Veränderungen der Zelle zu einem geringeren Methylierungsgrad der DNA führen, was eine höhere HERV-K-Expression bewirkt⁹⁵. Dies würde dafür sprechen, dass es sich bei der Expression von HERV-K eher um einen Begleiteffekt der Karzinogenese handelt.

In Melanomzelllinien wurde dagegen gezeigt, dass die Repression von HERV-K durch eine *short hairpin* RNA mittels RNA-Interferenz die Umwandlung zu malignen, nicht adhären, schnell proliferierenden, polynuklearen Zellen inhibiert⁹⁶. Dies ließ wiederum vermuten, dass die Expression von HERV-K zur Umwandlung zu malignen Zellen beiträgt und keinen Begleiteffekt darstellt⁹⁶.

2.3.3.1.3 Rec

Das Rec-Protein ist ein akzessorisches Protein von HERV-K Typ 2. Es ist funktionell analog zu den Exportproteinen Rev aus HIV und Rex aus HTLV. Rec exportiert die virale RNA von HERV-K aus dem Zellkern in das Zytoplasma.

Es konnte gezeigt werden, dass von 17 HERV-K-Proviren, die im humanen Genom vorliegen, noch sieben in der Lage sind, das Rec-Protein (*regulator of expression encoded by central open reading frame*) zu exprimieren.⁹¹

2.3.3.1.3.1 Funktion von Rec

Der Export von RNA durch Rec wird über das Exportprotein Crm1 (*chromosome region maintenance interacting protein 1*) vermittelt.^{97, 98} Die Bindung von Rec an Crm1 ist RanGTP

abhängig.^{97, 99} Wird der Export über Crm1 selektiv inhibiert, akkumuliert Rec im Zellkern. Hieraus wurde geschlossen, dass es sich bei Rec, ähnlich wie bei Rev in HIV, um ein nucleoplasmatisches Transferprotein handelt, welches ungespleißte RNA über einen Crm1 abhängigen Weg ins Zytosol exportiert^{97, 98}.

Die Expression des *gag*-Gens von HERV-K ist wie bei HIV postranskriptionell reguliert. In Abwesenheit des RcRE wird das Spleißen der viralen mRNA nicht gehemmt und es kommt zur starken Expression des Rec-Proteins von doppelt gespleißter mRNA. Die Anwesenheit des RcRE erhöht den Anteil an unvollständig gespleißter oder ungespleißter viraler RNA im Zytosol. Die Expression von *gag* konnte in Anwesenheit des RcRE um das 10-fache gesteigert werden und liegt in dessen Abwesenheit nur bei 6%. Demnach induziert Rec die Expression der strukturellen Proteine, wenn es mit dem RcRE wechselwirkt. Rec fungiert folglich wie Rev als Stabilisator ungespleißter RNA und exportiert diese ins Zytoplasma.⁹⁸

Aus diesen Daten konnte ein Funktionsmodell für Rec abgeleitet werden⁹⁹, welches in Abbildung 2-24 dargestellt ist.

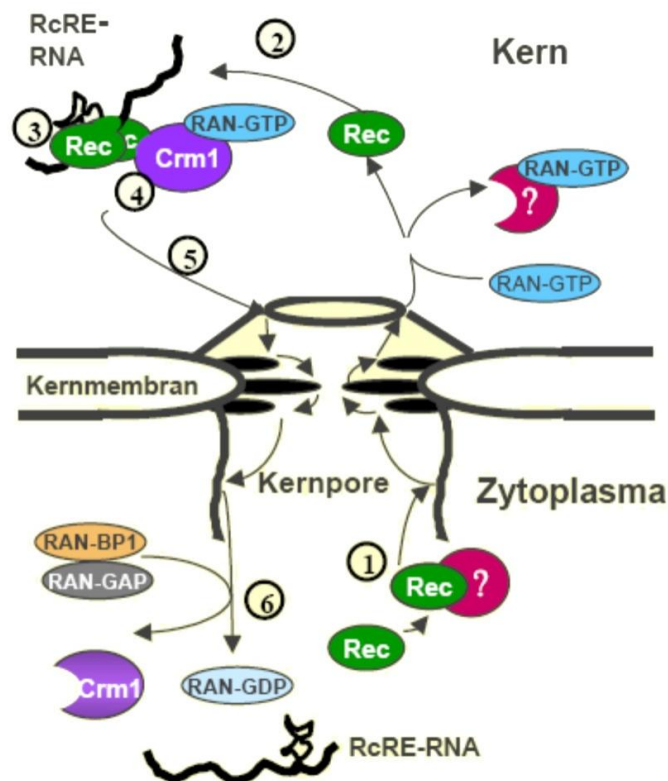


Abbildung 2-24: Schematische Darstellung der Funktion von Rec.

1) Rec wird in den Zellkern importiert 2) Rec bindet im Zellkern an das RcRE 3) weitere Rec-Proteine binden an das RcRE 4) Crm1 bindet an das nukleare Exportsignal von Rec und rekrutiert RanGTP 5) der Komplex wird exportiert 6) GTP wird hydrolysiert und der Exportkomplex zerfällt.
Entnommen aus Hahn⁹⁹

Rec gelangt über die NLS in den Zellkern. Dort wechselwirkt Rec mit dem RcRE, welches in der U3-Region des 3'-LTR liegt. Wahrscheinlich stellt hierbei das Tryptophan innerhalb der leucinreichen Domäne den Kontaktpunkt zwischen Rec und RcRE dar. Rec bindet als

Oligomer an das RcRE, wobei die leucinreichen Domänen an der Oligomerisierung beteiligt sind. Durch das NES bindet Crm1 in Anwesenheit von RanGTP an die Rec-Oligomere und der Komplex wird über die Nukleopore exportiert. Im Zytosol wird GTP hydrolysiert und der Exportkomplex zerfällt. Rec wird über sein NLS wieder in den Kern importiert.^{98, 99}

2.3.3.1.3.2 Struktur von Rec

Rec wird von doppelt gespleißter *env*-mRNA translatiert. Es konnte zuerst im Zelllysat von Teratokarzinomen nachgewiesen werden und liegt vorwiegend im Zellkern vor^{98, 100}.

Rec verfügt über ein argininreiches Kernlokalisierungssignal (*nuclear import signal*/ NLS) und Mutationsstudien zeigten, dass diese Domäne auch an der RNA-Bindung beteiligt ist^{99, 101}. Eine schematische Darstellung von Rec ist in Abbildung 2-25 gezeigt.

Rec besitzt zwei leucinreiche Domänen.⁹⁹ Bei einer der Domänen ist das erste Leucin durch Tryptophan ersetzt worden (WAQLKKLTQL)¹⁰⁰. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die ersten beiden hydrophoben Aminosäuren der leucinreichen Domänen für die Exportfunktion von Rec relevant sind. Das NES (*nuclear export signal*) liegt im Bereich der zweiten leucinreichen Domäne.⁹⁹ Durch Mutationsstudien konnte gezeigt werden, dass sowohl die leucinreiche als auch die argininreiche Domäne für die Bindung von Rec an das *rec responsive element* (RcRE) benötigt werden.⁹⁹



Abbildung 2-25: Schematische Darstellung von Rec.

Rec verfügt über ein Kernimportsignal (NLS) und zwei leucinreiche Domänen (LRD1 und LRD2). Innerhalb von LRD2 liegt das Kernexportsignal (NES).

Durch Quervernetzungsstudien von Rec konnte nachgewiesen werden, dass Rec Homooligomere bildet, wobei hauptsächlich Dimere oder Tetramere auftraten.^{97, 99} Diese Oligomerisierung ist für den Aufbau des RNA-Rec-Komplexes essenziell.⁹⁹ Die Deletion der ersten oder zweiten leucinreichen Domäne führt zur Inhibition der Oligomerisierung von Rec.⁹⁹

2.3.3.1.3.3 Kanzerogene Wirkung von Rec

Das Rec-Protein von HERV-K scheint eine wesentliche Rolle in der Karzinogenese zu spielen. Bei der Injektion von *rec* exprimierenden Zellen in Nacktmäuse entwickelte sich innerhalb von 53 Tagen ein Tumor, während bei *gag* exprimierenden Zellen keine Tumorbildung nachgewiesen werden konnte. Der gleiche Effekt konnte bei der Expression von Rec bzw. Env in Rattenzellen gezeigt werden.¹⁰²

In Mäusen konnte zusätzlich beobachtet werden, dass die Entwicklung der Keimzellen durch die Expression von Rec gestört wird. Hier wurden nach vier Monaten Veränderungen im Hodengewebe beobachtet, welche nach 19 Monaten eindeutig als Transformationen zu

Tumorzellen identifiziert werden konnten. Diese *rec*-induzierten Veränderungen konnten nur im Hoden-, nicht aber in anderen Geweben, wie der Leber oder Niere beobachtet werden. Hieraus wurde geschlossen, dass Rec die Entwicklung von Keimzelltumoren induziert.¹⁰³

Rec, Env und Np9 konnten in Melanomzellen und Melanomzelllinien nachgewiesen werden, während dies in embryonalen Nierenzellen nicht möglich war. Wurde das Melanomgewebe genauer betrachtet, konnte Rec nur in den Melanomzellen, aber nicht im umliegenden Gewebe gefunden werden.¹⁰⁴ Patienten mit Melanomen verfügten nicht über Antikörper gegen Rec oder Np9. Allerdings konnten Antikörper gegen Env nachgewiesen werden, was bei gesunden Patienten nicht der Fall war.¹⁰⁴

Rec bildet große Komplexe mit zellulären Proteinen, wie z. B. dem *promyelocytic leukemia zinc finger protein* (PLZF).¹⁰² Hierbei bindet Rec mit dem C-Terminus und einer zentralen Region an PLZF, während PLZF über seine prolinreiche Region und die nachfolgenden fünf Zink-Finger-Motive mit Rec im Zellkern wechselwirkt.^{102, 105} Alle neun Zink-Finger-Motive scheinen jedoch für die Wechselwirkung mit Rec essenziell zu sein.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ PLZF wirkt als Transkriptionsrepressor und ist z. B. bei der Entstehung von Leukämie in Menschen und der Spermatogenese in Mäusen wichtig.^{107, 108} PLZF wirkt z. B. am *c-myc*-Promotor als Transkriptionsrepressor.¹⁰⁶ Es konnte beobachtet werden, dass Zellen, die nur PLZF exprimieren, öfter Apoptose begehen als Zellen, in denen PLZF und Rec coexprimiert werden.¹⁰⁵ Wahrscheinlich induziert die Bindung von Rec und PLZF Zellwachstum und Zellteilung.¹⁰⁵ Die onkogene Wirkung von Rec liegt möglicherweise in der Verhinderung der Repression von *c-myc* durch PLZF.^{102, 105}

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Rec auch mit dem *testicular zinc finger protein* (TZFP) wechselwirkt. Auch hier interagiert das Protein über die Zink-Finger-Domäne mit der C- und der N-terminalen Region von Rec.¹⁰⁹ TZFP wird hauptsächlich in den Hoden exprimiert und ist dort während der Spermatogenese aktiv.¹¹⁰ TZFP ist mit PLZF verwandt und verfügt über drei C₂H₂-Zink-Finger-Motive und wirkt wahrscheinlich auch als Transkriptionsrepressor.¹¹¹ Im Zellkern konnte ein trimere Komplex aus dem humanen Androgenrezeptor, TZFP und Rec nachgewiesen werden. Rec fungiert dabei als Derepressor bzw. Transaktivator durch die Inhibition von TZFP. Es wird vermutet, dass es hierdurch zur Expression des Protoonkogens *c-myc* kommt.¹⁰⁹

2.3.3.2 Das Rec responsive Element RcRE

RcRE (Rec responsive Element) ist die Bindestelle von Rec auf der RNA, womit der Export ungespleißte virale RNA vermittelt wird.^{99, 112} Es ist stark strukturiert und umfasst 429 Nukleotide.^{98, 112}

Verschiedene, natürlich vorkommende RcREs innerhalb der HERV-K-Familie können von Rec exportiert werden, so z. B. auch das RcRE pck30. Beim Vergleich mehrere RcREs

wurde eine Konsensussequenz erstellt, die bis auf ein Nukleotid mit der Sequenz des RcRE pck30 übereinstimmt. Hierbei konnte beobachtet werden, dass einzelne Punktmutationen den Export kaum beeinflussen.¹¹² Die Analyse von Deletionsmutanten zeigte, dass alle Mutanten noch imstande waren, Rec zu binden, obwohl einige nicht mehr exportiert werden konnten. Dies unterstützt die Vermutung, dass Rec an mehrere Stellen auf dem RcRE bindet und verschiedene Kontakte für die Ausbildung eines aktiven Exportkomplexes nötig sind.¹¹²

2.3.3.2.1 Sekundärstruktur des RcRE

Die 2D-Struktur des RcRE pck30 wurde mit SHAPE und *in-line probing* analysiert und ist in Abbildung 2-26 A dargestellt.

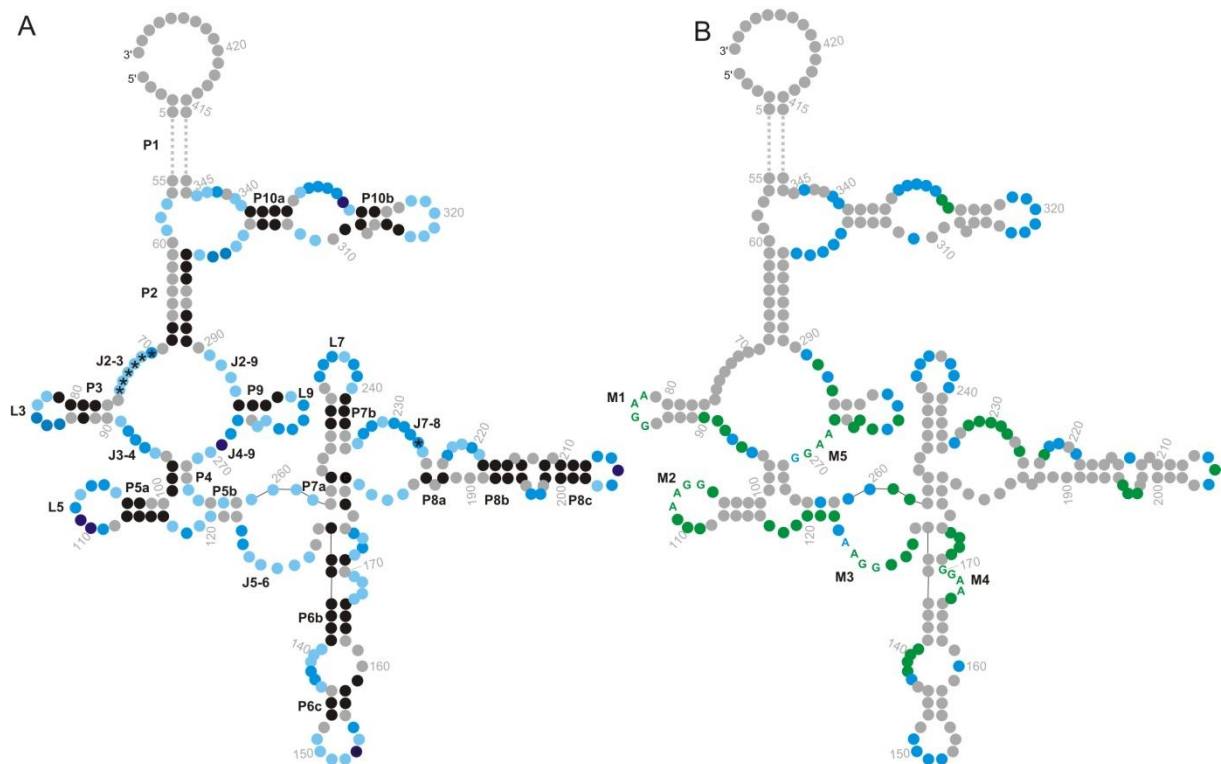


Abbildung 2-26: 2D Strukturmodell von RcRE pck30 basierend auf SHAPE und In-line *probing*s.
Der 50 nt lange abschließende Stamm P1 ist durch gestrichelte Linien angezeigt. A: Struktur von RcRE pck30 mit SHAPE Aktivitäten. Schwarze Nukleotide liegen im Doppelstrang vor, während hellblaue wenig, mittelblau stark und dunkel blaue sehr hohe SHAPE Reaktivität und damit Flexibilität zeigten. Über die Sekundärstruktur der grauen Nukleotide konnte keine Aussage getroffen werden. Mit einem Stern markierte Nukleotide, konnten nur mit In-Line *probing* analysiert werden. P steht für Stamm, L für Schleife und J für Knotenpunkt. B: Sekundärstruktur von RcRE pck30 mit hervorgehobenen Nukleotiden, die bei der Bindung von Rec Veränderungen in der SHAPE Reaktivität zeigten (grün) bzw. bei der Zugabe von Magnesiumionen (blau). Die purinreichen Motive innerhalb der potentiellen Rec Bindestellen sind durch Buchstaben dargestellt und mit M1 bis M5 beschriftet. Nach Langner et al.¹¹³

Die Struktur des RcRE pck30 ist sehr komplex. Das 3'- und das 5'-Ende beider Strukturen falten sich zu einem langen, strukturierten Stamm, während der Rest der Struktur aus 10 Stammschleifen mit mehreren Ausbauchungen besteht. Die Strukturanalyse von RcRE pck30 wurde zusätzlich in Anwesenheit von Magnesiumionen durchgeführt und es konnte gezeigt werden, dass die Sekundärstruktur dadurch stabilisiert wird (Abbildung 2-26 B, blaue Nukleotide). Dies deutet auf tertiäre Interaktionen zwischen Schleifen hin. Des Weiteren

wurde das RcRE pck30 in Anwesenheit von Rec analysiert und somit potentielle Bindestellen auf der RNA bestimmt (Abbildung 2-26 B, grüne Nukleotide). Es zeigte sich, dass Rec vor allem im zentralen Bereich der Struktur potentielle Bindestellen besitzt und diese oft über purinreiche Motive verfügen. Diese purinreichen GGAA- bzw. AAGG-Motive könnten potentielle Bindemotive darstellen, da diese auch innerhalb der HERV-K Familie konserviert sind.¹¹²

Zur weiteren Charakterisierung der Bindung von Rec an das RcRE pck30 wurden LILBID-Messungen durchgeführt.¹¹³ Hierbei handelt es sich um eine sanfte Massenspektrometrie, welche die Untersuchung der Stöchiometrie von Oligomeren erlaubt, da nicht-kovalente Bindungen auch während der Analyse erhalten bleiben.¹¹⁴

Es konnte gezeigt werden, dass Rec bevorzugt Tetramere bildet und diese an das RcRE pck30 binden. Wurde Rec im Verhältnis 1:1 zur RNA gegeben, interagierten ausschließlich Tetramere mit der RNA. Bei höheren Rec Konzentrationen konnten auch größere Komplexe von bis zu vier Rec-Tetrameren und einem RcRE pck30 beobachtet werden. Die Rec-Tetramere wurden durch die Bindung an die RNA stabilisiert.¹¹³ Für die Bindung von Oligomeren sprechen auch Gelverzögerungsexperimente.⁹⁷ Hierbei oligomerisieren die Rec-Proteine wahrscheinlich über ihre leucinreichen Domänen, während die Bindung an das RcRE über die argininreiche und die leucinreichen Domänen möglich ist.⁹⁹

Auf Basis dieser Daten wurde ein Bindungsmodell entwickelt, wonach Rec als Tetramer primär mit hoher Affinität an purinreiche Motive binden könnte. Hierbei wäre es denkbar, dass jedes Monomer mit einem Bindungsmotiv wechselwirkt oder dass nur einige Untereinheiten mit diesen Bindungsmotiven interagieren. Im nächsten Schritt könnten weitere Tetramere an die RNA rekrutiert werden und an weitere Strukturelemente der RNA binden. Somit würde sich letztendlich ein Komplex aus zwei bis drei Tetrameren an einem RcRE bilden. Es wäre auch denkbar, dass in einem zweiten Schritt Rec-Proteine die Bindung durch die Wechselwirkung mit weniger affinen Bindungsstellen festigen. Diese weniger affin gebundenen Strukturen könnten z. B. weitere Schleifen oder purinreiche Sequenzen darstellen. Natürlich wäre auch eine Kombination aus diesen beiden Modellen denkbar.¹¹⁵

2.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von synthetischen RNA-Schaltern, mit welchen zelluläre Prozesse, wie die virale Replikation oder das Spleißen der mRNA ligandenabhängig kontrolliert werden können. In einem weiteren Teilprojekt sollte die Bindung des viralen Rec-Proteins an das RcRE pck30 detailliert charakterisiert werden.

Nachdem im Rahmen meiner Diplomarbeit die Sekundärstruktur des RcRE pck30 aufgeklärt wurde zeigte sich, dass viele potentielle Bindestellen von Rec auf der RcRE pck30

purinreiche Motive enthalten. Diese potentiellen Bindemotive sollten charakterisiert werden. Hierzu wurde die Bindung von Rec an Haarnadelstrukturen mit purinreichen Motiven in den Schleifen durch Gelverzögerungsexperimente untersucht. Des Weiteren wurden die potentiellen, purinreichen Bindemotive mutiert und die Bindung bzw. der Export der Mutanten durch Rec untersucht. Mit den gewonnenen Daten sollte das bestehende Bindungsmodell erweitert werden.

Um ein Projekt der synthetischen Biologie ging es im Hauptteil dieser Arbeit. Zum einen sollten RNA-Schalter entwickelt werden, welche die virale Replikation von SFV ligandenabhängig kontrollieren können. Dies wurde bereits durch die erfolgreichen Kontrolle der Replikation eines Pflanzenvirus gezeigt.⁸¹ Dieser Ansatz sollte nun auf einen Säugetiereinfizierenden Virus übertragen werden, um später als Sicherheitssystem zum Abschalten therapeutischer Viren eingesetzt zu werden. Als Modellsystem wurde SFV gewählt, da dieser bereits als onkolytischer Virus getestet wird⁷⁶ und Gegenstand der aktuellen Forschung ist. Ein etabliertes Regulationssystem könnte sowohl als Sicherheitssystem für einen onkolytischen Virus als auch als Werkzeug zur weiteren Charakterisierung von SFV eingesetzt werden.

Der Virus sollte entweder über ein Tetrazyklin bindendes Aptamer im Bereich des subgenomischen Promotors oder über ein sich selbst spaltendes Theophyllin abhängiges *hammerhead* Ribozym reguliert werden. Für die Studien wurde ein kleines, gut charakterisiertes, sicheres Replikon von SFV eingesetzt, welches *gfp* als Reportergen enthält.

Ein weiteres Projekt hatte zum Ziel, alternatives Spleißen mithilfe eines Aptamers zu regulieren. Fast alle menschlichen Gene werden alternativ gespleißt und oft wird darüber auch deren Aktivität reguliert. Ein Fehler in diesem Vorgang kann zu schwerwiegenden Krankheiten führen, weshalb alternative Spleißformen Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten sind. In Hefe konnte bereits erfolgreich das Spleißen durch das Tetrazyklin bindende Aptamer reguliert werden.⁶³

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das TetR bindende Aptamer zur Regulation des alternativen Spleißens genutzt werden. Im ersten Schritt wurde das Spleißen eines Minigens reguliert. Der im Minigen entwickelte Schalter wurde im nächsten Schritt auf eine mRNA übertragen. Hierzu wurde die Luziferase-mRNA eingesetzt, da diese eine einfache Detektion ermöglicht. Zusammenfassend sollten Werkzeug zum Umschalten zwischen unterschiedlichen Spleißvarianten erschaffen werden, was in der Forschung zur Analyse unterschiedlicher Spleißformen genutzt werden könnte.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Tabelle 3-1: Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid (Rotiphorese Gel 40)	Roth, Karlsruhe
Agar	Oxoid, Heidelberg
Agarose peqGold Universal	PeqLab, Erlangen
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP)	PeqLab, Erlangen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, USA
Doxycyclin	Sigma-Aldrich, USA
Essigsäure (NaAc)	Roth, Karlsruhe
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt
Ethanol vergällt	VWR, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Formamid	Roth, Karlsruhe
Glasgow's Minimum Essential Medium (GMEM)	Life Technologies, USA
Glycerin 100%	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Oxoid, Heidelberg
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe

Magnesiumchlorid Hexahydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natrium-Pyruvat	Life Technologies, USA
Natronlauge (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Phosphate-Buffered-Saline (PBS)	Life Technologies, USA
Roti Aqua Phenol	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Sucrose	Sigma-Aldrich, USA
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tetrazyklin	Sigma-Aldrich, USA
Theophyllin	Sigma-Aldrich, USA
Tris	Roth, Karlsruhe
0,5% Trypsin-EDTA	Life Technologies, USA
Trypton	Oxoid, Heidelberg
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe

3.1.2 Hilfsmittel

Tabelle 3-2: Hilfsmittel

Hilfsmittel	Bezugsquelle
<i>Amersham Hybond-P</i> PVDF Membran	GE Healthcare, England
Becher, Glas	Schott Duran, Jena
Becher, Kunststoff	Vitlab, Grossostheim
Drigalski-Spatel	A. Rösch, FAU Erlangen-Nürnberg
Einmal-Dispenserspritzen	Greiner, Nürtingen
Einmalhandschuhe	VWR, Darmstadt
Elektroporationsküvette, 0,4 cm	Bio-Rad, USA
Einmal-Spritze	Becton Dickinson, Heidelberg
Gelkammern	CBS, USA

Glaspipetten	Whatman, England
Glasplatten (10/20cm)	CBS, USA
Messzylinder	Vitlab, Grossostheim
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml	peqLab, Erlangen
Petrischalen, Kunststoff	Greiner, Nürtingen
Pipetman acu	IBS Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten (2, 20, 200, 1000 µl)	Gilson, Frankreich
Pipettenspitzen, Kunststoff	Greiner, Nürtingen
Pipettierhelfer, macro	Brand, Wertheim
Plexiglasscheiben	M. Müller, FAU Erlangen-Nürnberg
Polyethylenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Reagenzgläser	Schott Duran, Jena
Reaktionsgefäße (1,5 ml/2,0 ml)	Greiner, Nürtingen
Schikanekolben	Schott Duran, Jena
Schraubflaschen	Schott Duran, Jena
Skalpellschlinge	Roth, Karlsruhe
Stericup	Millipore, Frankreich
Sterilfilter Filtropur S 0,2; S 0,45	Sarstedt, Nürnberg

3.1.3 Geräte

Tabelle 3-3: Geräte

Geräte	Bezugsquelle
Autoklav	Gefinge, Schweden
Autoklaviertopf	Siltram, Frankreich
Biofuge (Fresco17, Pico17, PrimoR)	Heraeus Christ, Osterode
Brutschrank (28°C, 37°C)	Heraeus Christ, Osterode
Bunsenbrenner	VWR, Darmstadt
Eismaschine	Scotsman Ice System, USA
Elektrophoreseapparatur für Agarose- und Polyacrylamidgele	B. Macht, FAU Erlangen-Nürnberg; Roth, Karlsruhe
FACS Cytomics FC500	Beckman Coulter, USA

Material und Methoden

Electrophoresis Power Supply Consort	PeqLab, Erlangen
Feinwaage	Acculab, USA
Fluorolog	Horiba, Japan
Geldokumentation	INTAS, USA
Gene Pulser Xcell eukaryotic system	Bio-Rad, USA
Heizblock	VWR, Darmstadt
Inkubationsschüttler Multitron	Infors AG, Bottmingen
Kochplatte	Rommelsbacher GmbH, Dinkelsbühl
Kühlschrank	Liebherr, Schweiz
Kulturschüttler Mixer 5432	Eppendorf AG, Hamburg
Magnetrührer IKA RET basic	IKA, Staufen
Mikrowelle	AEG, Frankfurt am Main
Multifuge 1L-R	Heraeus Christ, Osterode
NanoDrop ND-1000 Spektrophometer	PeqLab, Erlangen
Plate Reader infinite M200Pro	Tecan, USA
PCR-Maschine	PeqLab, Erlangen
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Phosphoimager Typhoon 9400	GE Healthcare, USA
Spannungsnetzgerät	Bio-Rad, USA
Thermocycler Primus 25	PeqLab, Erlangen
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
ThermoStat plus	Eppendorf AG, Hamburg
Tiefkühltruhe (-80°C)	Heraeus Christ, Osterode
Trockenschrank	Heraeus Christ, Osterode
Ultrazentrifuge L8-70M Ultracentrifuge	Beckmann Coulter, USA
UV-Handlampe (254 nm)	UVP, USA
Waage	Acculab, USA
Wärmeschrank	EHRET, Emmendingen
Wasser DEPC-behandelt, -steril und autoklaviert	Roth, Karlsruhe
Wasserbad	Julabo, Seelfeld
Wasservollentsalzungsanlage Synergy	Millipore, Frankreich

3.1.4 Kommerziell erhältliche Systeme

Tabelle 3-4: Kommerziell erhältliche Systeme

System	Bezugsquelle	Anwendung
peqGOLD Ultra Low Range DNA-Leiter	PeqLab, Erlangen	Größenabschätzung von DNA-Fragmenten
DNA-Ladepuffer (6x)	PeqLab, Erlangen	Auftragen von DNA auf Agarosegel
<i>ECL Plus western blotting detection reagents</i>	GE Healthcare, England	Entwicklung von Western Blot mit Chemolumineszenz durch HRP
GlycoBlue	Invitrogen, USA	Anfärben von Pellet bei RNA Fällung
Maxtrakt (1,5/ 2/ 15ml)	Qiagen, Hilden	Auftrennen von Nukleinsäuren und Proteinen
mMESSAGE mMACHINE SP6 Kit	Life Technologies, USA	<i>In vitro</i> Transkription von mRNA mit SP6 - Polymerase
NEB Low Range ssRNA Leiter	BioLabs, New England	Größenabschätzung von einzelsträngigen RNA-Fragmenten
peqGOLD 1 kb DNA-Leiter	PeqLab, Erlangen	Größenabschätzung von DNA-Fragmenten
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden	Plasmidpräparation
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden	Elution von DNA aus Agarosegelen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden	Reinigung von PCR Produkten
QIAquick Spin Miniprep	Qiagen, Hilden	Plasmidpräparation
RIPA-Puffer	Sigma-Aldrich- USA	Präparation von Proteinen aus eukaryotischen Zellen
Trizol	Life Technologies, USA	Präparation von RNA aus eukaryotischen Zellen

3.1.5 Verwendete Enzyme und Proteine

Tabelle 3-5: Verwendete Enzyme und Proteine

Enzyme und Proteine	Bezugsquelle
Polymerasen:	
Phusion DNA-Polymerase (2000 U/ml)	FINNZYMES, Finnland

Material und Methoden

T7 RNA-Polymerase	<i>home made</i> , AG Süß
Taq DNA-Polymerase (5000 U/ml)	BioLabs, New England
Restriktionsendonukleasen:	
Agel-HF (20000 U/ml)	BioLabs, New England
Apal (50000 U/ml)	BioLabs, New England
AvrII (5000 U/ml)	BioLabs, New England
BamHI-HF (20000 U/ml)	BioLabs, New England
BbvCI (2000 U/ml)	BioLabs, New England
BglII (10000 U/ml)	BioLabs, New England
Clal (10000 U/ml)	BioLabs, New England
EcoRI (10000 U/ml)	BioLabs, New England
NcoI-HF (20000 U/ml)	BioLabs, New England
NheI-HF (20000 U/ml)	BioLabs, New England
NotI-HF (20000 U/ml)	BioLabs, New England
SpeI (10000 U/ml)	BioLabs, New England
XbaI (10000 U/ml)	BioLabs, New England
XhoI (20000 U/ml)	BioLabs, New England
XmaI (10000 U/ml)	BioLabs, New England
Sonstige Enzyme/Proteine:	
Alkalische Phosphatase (<i>from Calf Intestine</i>) (1000 U/ml)	Roche, Mannheim
Antikörper Kaninchen anti - Maus IgG HRP konjugiert	Jackson ImmunoResearch, USA
Antikörper Kaninchen anti - β -Aktin	Santa Cruz Biotechnologies, USA
Antikörper Maus anti – GFP	Roche, Schweiz
Antikörper Ziege anti - Kaninchen IgG HRP konjugiert	Jackson ImmunoResearch, USA
BSA (Rinderserumalbumin)	BioLabs, New England
CIP (calf intestinal alkaline phosphatase) (10000 U/ml)	BioLabs, New England
PNK (Polynukleotidkinase) (10000 U/ml)	Roche, Mannheim
Rec (<i>regulator of expression encoded by corf</i>)	<i>home made</i> , Dr. Oliver Weichenrieder , MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen
SuperScript® II/III (200000 U/ml)	Life Technologies, USA
Turbo DNase (2 U/ μ l)	Life Technologies, USA

3.1.6 Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 3-6: Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'→3')	Verwendung
beta-Actin-99bp-f	cgggacctgactgactacctc	Oligonukleotide für RT-PCR von β -Aktin
beta-Actin-99bp-r	cttctccttaatgtcacgcacg	Oligonukleotide für RT-PCR von β -Aktin
Ds_GGAA (3-5)	gcattcttagagatcatattcctcgccga cggaacgacaagatatacgacctata	Klonierung von Haarnadelstruktur mit GGAA-Motiv im Dopplestrang
Ds_GGAA (5-3)	gcattcgaattctaatacgactcactatag gtcgtatatcttctg	Klonierung von Haarnadelstruktur mit GGAA-Motiv im Dopplestrang
Frag_ fwd 2tc vor AUG	Caacaaacctaggtcccatatg ccaggtaaaacataccagatgaaagtc tggagagg	Klonierung von 2Tc vor AUG
Frag_rev 2tc vor AUG	ttgttgatcgatccaggtaggtggtctgtat tcttcacctctccagactttcatctg	Klonierung von 2Tc vor AUG
Fragment 1_ASF	agaagtccaagttatggaagatctcgatt cgaagccgtagtcgtagcagaagc	Klonierung von TetR-ASF
Fragment 2_ASF	cgtagcagaagcaacagcaggagtcg cagttactccccaaggagaagcagagg atcac	Klonierung von TetR-ASF
Fragment 3_rev ASF	tccttggggagtaactgcgactcctgctgt tgcttctgctacggcttctgctacgac	Klonierung von TetR-ASF
Fragment 4_rev ASF	ttatgtacgagagcgagatctgctatgac ggggagaatagcgtggtgatcctctgctt c	Klonierung von TetR-ASF
Fwd_ pGL4 ExII (UH IntronI)	gtgtttctcttttttcagggtccaaagcat gtacaccttc	Klonierung von Introns aus pMA in pGL4.10
Fwd_ pGL4 exon III (UH Intron II)	caataatcataattcttttttcaggggcgta gccctaccgcac	Klonierung von Introns aus pMA in pGL4.10

Material und Methoden

Fwd_ pGL4 intron II (UH ExII)	ggcagtagccggattgcccaagtaagtgc gtatcaagcagc	Klonierung von Introns aus pMA in pGL4.10
Fwd_ pGL4 intron II (UH ExII)- Apt	ggcagtagccggattgcccaagtaagtgc tagctggccag	Klonierung von Introns aus pMA in pGL4.10
Fwd_ pGL4 intron II stron 5'SS (UH ExII)	ggcagtagccggattgcc gaggtgagtgcgtatcaagcagc	Klonierung von Introns aus pMA in pGL4.10
Fwd_ pMA InI(UH ExI luci)	gatagcaagaccgactaccaggtactg gctggattgggttag	Klonierung von InI + ExII + InII in Luziferase
Fwd_ pMA InII UH TetR Apt kurz	gggtcatcacagaccagagaaaagct gatcgctagctggccagtgcgatc	Klonierung von Introns aus pMA in pGL4.10
Fwd_ pMA InII UH TetR Apt kurz in SS	gggtcatcacagaccagagaaaagct gaacgctagctggccagtgcgatc	Klonierung von TetR Aptamer kurz in pGL4.10_InII in Luci
Fwd_ pMA InII UH TetR Apt sehr kurz	gggtcatcacagaccagagaaaagct gatgctagctggccagtgcgatc	Klonierung von TetR Aptamer seh kurz in pGL4.10_InII in Luci
fwd_ xhoI TetR apt apal	tcgaggcgtatcaagcagcatgttatgg gtcatcacagaccagagaaaagctga tacgcgggcc	Klonierung von TetR Apt in Exon in pGFP Minigen
Fwd_ASF (UH TetR)	gactcaggaggcgggtgatctagaagt ccaagttatggaagatctc	Klonierung von TetR-ASF
Fwd_CMV + XhoI	caacaactcgagctcgagttaccactc cctatc	Klonierung von CMV- Promotor
Fwd_exI GFP	cacgctagcgtaccggctgccac	Oligonukleotide für Spleiß-PCR für GFP Minigen
Fwd_ExII i6u555 + NcoI	Caacaa ccat gg ccaaacaaccaaac	Klonierung von InI + ExII + InII aus pMA in pGL4.10
Fwd_hnRNP A1 (UH TetR)	gactcaggaggcgggtgatctggtcga agtgggtctggaac	Klonierung von TetR-hnRnP A1

Material und Methoden

Fwd_in CMV vor BglII	aaccgtcagatcgctggag	Klonierung von diversen pGL4.10 Konstrukten
Fwd_M1	P- actgcggatcgccgcag	Einfügen von Mutation M1 in AAGG-Motiv
Fwd_M2	P-acctctgcctagttcagccaggtattg	Einfügen von Mutation M2 in GGAA-Motiv
Fwd_M3	P- ggtattgtccaccgtttctcccc	Einfügen von Mutation M3 in AAGG-Motiv
Fwd_M4	P-ctcgtgggaccggaaagacc	Einfügen von Mutation M4 in AAGG-Motiv
Fwd_M5	P- tgagacaagagctaggcatctgtctcc	Einfügen von Mutation M5 in GGAA-Motiv
Fwd_mut Theohhi in SFV UTR	P- caaataggacgagagccataaccagc	Einfügen für Mutation zur Inaktivierung von Theohh in 3'-UTR
Fwd_pGL4 ExIII (UH InII pMA)	gcaataatcataattcttttcagggcttcc aaagcatgtacacc	Klonierung von InI + ExII + InII in Luziferase
Fwd_pGL4 intron I (UH exI)	gatagcaagaccgactaccaggtactg gctggattgggttag	Klonierung von Introns aus pMA in pGL4.10
Fwd_pGL4 vor ATG	ggcaatccggtactgttgg	Klonierung von Introns aus pMA in pGL4.10
Fwd_pMA Tet Apt mut (UH ExII)	ccaaacaacacaagtaagtgcgtatca agcagctgttctggg	Klonierung von TetR Apt mut in pMA_CMV i6u555 TetR Apt 5'SS
Fwd_pMA Tet Apt mut (UH ExII)	ccaaacaacacaagtaagtgcgtatca agcagctgttctggg	Klonierung von TetR Apt mut in pMA
Fwd_RcRE pck30 + SacII	caacaaccgcgacagatgcttgaagg cagc	Primer für Amplifikation von mutierter Region

Material und Methoden

Fwd_SFV 3'UTR	agggtaagcaatggcatataac	Amplifikation von bestellten Theohh in 3'-UTR Konstrukten
Fwd_SFV AUG in Tc (ÜH Sg neu)	gtaatacacagctaagggccatacat cctaaaacataccagatgaaag	Klonierung von AUG in Tc
Fwd_SFV GFP	atgggtgagcaagggcgag	Klonierung von Tc an AUG und AUG in Tc
Fwd_SFV mCherry statt GFP + ClaI	caacaaatcgatatgggtgagcaagggc gagga	Klonierung von mCherry in pSFV-RD
Fwd_SFV NSP4	agacggacattgcatcattcg	Amplifikation des ORF von nSP4
Fwd_SFV SG/GFP	caggacgaagacaggcgac	Amplifikation von bestellten Tc vor AUG-Konstrukten
Fwd_TetR Apt + NheI	ttgttggttagcgcgatatcaagcagcatg ttatgggtcatc	Klonierung von TetR Apt lang in pMA Minigen
Fwd_TetR+c-myc NLS+ EcoRI	caacaagaattcaccgcccgcgaa acgcgtgaaactggatatgtctagactg gacaagagc	Klonierung von TetR
Fwd3_CMV pWHE211 inkl. xhoI	cttcttctcgaggagcttgccc	Klonierung von CMV-Promotor
Hairpin_purinrich(3-5)	gcattcttagagatcatactgctgcggt tacttcgacaagctgtacgacctata	Klonierung von Haarnadelstruktur mit purinreicher Schleifenstruktur
Hp_AAGGloop(3-5)	gcattcttagagatcatactgctgcggt cccttcgacaagctgtacgacctata	Klonierung von Haarnadelstruktur mit AAGG-Motiv in Schleifenstruktur
Hp_allkIRNAs(5-3)	gcatttgaattctaatacgactcactatag gtcgtacagctgtgc	Klonierung von Haarnadelstruktur mit GGAA-Motiv in Schleifenstruktur
Hp_GGAAloop (3-5)	gcattcttagagatcatactgctgcggt cttcttcgacaagctgtacgacctata	Klonierung von Haarnadelstruktur mit GGAA-Motiv in Schleifenstruktur

Material und Methoden

Hp_GGAlloop(3-5)	gcattcttagagatcatactgctcgccg catcctcgacaagctgtacgacctata	Klonierung von Haarnadelstruktur mit GGA-Motiv in Schleifenstruktur
negcontrol (3-5)	gcattcttagagatcatactgctcgccg acggaacgacaagctgtacgacctata	Klonierung von Haarnadelstruktur mit pyrimidinreicher Schleifenstruktur
pDL_hRluc_qPCR_1_fwd	ctaacctcgcccttctcctt	qRT-PCR von <i>Renilla</i> Luziferase
pDL_hRluc_qPCR_1_rev	tcgtccatgctgagagtgtc	qRT-PCR von <i>Renilla</i> Luziferase
pDL_luc2_qPCR_1_fwd	gctcagcaaggaggtaggtg	qRT-PCR von Firefly Luziferase
pDL_luc2_qPCR_1_rev	tcttaccggtgtccaagtcc	qRT-PCR von Firefly Luziferase
pMA_exI-exIII_fwd	tgtcccagaataagggcatc	Oligonukleotide für Spleiß-PCR von pMA Minigen
pMA_exI-exIII_rev	cggaactgcctccaactatc	Oligonukleotide für Spleiß-PCR von pMA Minigen
pMA_klon_fwd	ggagcaaagtccggtcac	Sequenzieren von Minigen pMA
pMA_klon_rev	cctggaagaggaagctgg	Klonierung von TetR Apt mut in pMA_CMV i6u555 TetR Apt 5'SS
pSP64_seq_fwd	ccaggctttacactttatgc	Sequenzieren von pSP64
Rev _ pGL4 ExII (UH Intron II)	gctgcttgatacgacttacttgggcaatc cggtagctgcc	Klonierung von Introns aus pMA in pGL4.10
Rev _ pGL4 ExII (UH Intron II)	gctgcttgatacgactcacctcggcaat ccggtagctgcc	Klonierung von Introns aus pMA in pGL4.10

Material und Methoden

Rev _ pGL4 ExII (UH Intron II)-Apt	ctggccagctagcacttacttgggcaatc cggtagctgcc	Klonierung von Introns aus pMA in pGL4.10
Rev_ pGL4 intron II (UH ExIII)	gtgcggtagggctacgcccctgaaaaa agaattatgattattg	Klonierung von Introns aus pMA in pGL4.10
Rev_ pGL4 IntronI (UH ExII)	gaagggtgtacatgctttggaagccctga aaaaaagagaaaacac	Klonierung von Introns aus pMA in pGL4.10
Rev_ SFV NSP4	gcctgtccggaaccacttg	Amplifikation des ORF von nSP4
Rev_ TetR Apt + NheI	caacaagctagcgcgtatcaagctttct ctggtctgtgatgaccataacatgctgct tg	Klonierung von TetR Apt direkt hinter 5'SS von pMA Minigen
Rev_ TetR Apt kurz+ NheI	caacaagctagcgcgtatcaagctttctggt ctgtgatgaccataacatgctgctgac	Klonierung von TetR Apt kurz direkt hinter 5'SS in pMA Minigen
rev_ xhoI TetR apt apal	cgcgtatcaagctttctctggtctgtgatg accataacatgctgcttgatacgcc	Klonierung von TetR Apt in Exon in pGFP Minigen
Rev_ASF + AgeI	ttgttgaccggtttatgtacgagagcgag atctgc	Klonierung von TetR-ASF
Rev_ex III GFP	cacggatccttactgtacagctcgccat g	Oligonukleotide für Spleiß-PCR für GFP Minigen
Rev_ex III hinter bbvCI	agatcaagtagcccagcgtg	Klonierung von Introns aus pMA in pGL4.10
Rev_ExII UH TetR Apt sehr kurz	ggtctgtgatgaccataacatgctgctg atacttacttgggcaatccgg	Klonierung von TetR Aptamer sehr kurz in pGL4.10_InII in Luci
Rev_ExonII 5'SS (UH TetApt kurz)	gaccataacatgctgctgatcacttact gtgtgtttggtg	Klonierung von TetR Apt kurz direkt hinter 5'SS in pMA Minigen
Rev_ExonII 5'SS (UH TetApt)	gaccataacatgctgcttgatacgccact tactgtgtgtttggtg	Klonierung von TetR Apt direkt hinter 5'SS von pMA Minigen

Material und Methoden

Rev_ExonII strong 5'SS (UH TetApt)	gaccataacatgctgcttgatacgact cacctctgttgttgggtg	Klonierung von starker 5' SS in pMA_CMV_i6u555 TetR Apt 5'SS
Rev_hnRNPA1+ AgeI	ttgttgaccgggttaaaatcttctgccactg ccatag	Klonierung von TetR-hnRNP A1
Rev_i6u555 ExII + SG4 + ApaI	ttgtttgggcccttcttaatgttttggcatctt ctccaccgcctcctgatggccagctagc actgacttg	Klonierung von ExII und InII aus pMA vor Luziferase
Rev_InII i6u555 + SG4+ ApaI	caacaagggcccttcttaatgttttggcat cttctccaccgcctcctgacctgaaaaa gaattatgattattg	Klonierung von InI + ExII + InII aus pMA in pGL4.10
Rev_M1	tttgtgtccctgggtacttgagattagg	Einfügen von Mutation M1 in AAGG-Motiv
Rev_M2	ccctgcggccttcg	Einfügen von Mutation M2 in GGAA-Motiv
Rev_M3	tggctttcctaggcagaggcc	Einfügen von Mutation M3 in AAGG-Motiv
Rev_M4	Gccatatttcagactttcacatgggg	Einfügen von Mutation M4 in AAGG-Motiv
Rev_M5	actgcaagaggcattccttcctc	Einfügen von Mutation M4 in AAGG-Motiv
Rev_mut Theohhi in SFV UTR	P-gactcgtcagctggatgtacctg	Einfügen für Mutation zur Inaktivierung von Theohh in 3'-UTR
Rev_pGL4 ExI (UH InI pMA)	ctaaccaatccagccagctacctggtag tcggtcttgctatc	Klonierung von Introns aus pMA in pGL4.10
Rev_pGL4 ExII UH TetR Apt kurz	ggctgtgatgaccataacatgctgctg atcacttacttgggcaatccgg	Klonierung von Introns aus pMA in pGL4.10
Rev_pGL4 ExII UH TetR Apt kurz hinter ss	ggctgtgatgaccataacatgctgctg atccaacttacttgggcaatccgg	Klonierung von TetR Aptamer kurz in pGL4.10_InII in Luci

Material und Methoden

Rev_pGL4 ExII UH TetR Apt kurz in SS	ggctctgtgatgaccataacatgctgctg aacttactgggcaatccgg	Klonierung von TetR Aptamer kurz in pGL4.10_InII in Luci
Rev_pGL4 ExII UH TetR Apt kurz strong 5ss	ggctctgtgatgaccataacatgctgctg atcactcacttcggcaatccggtactgcc ac	Klonierung von TetR Aptamer kurz in pGL4.10_InII in Luci
Rev_pGL4 ExII UH TetR Apt sehr kurz strong SS	ggctctgtgatgaccataacatgctgctg atactcacttcggcaatccggtactgcca c	Klonierung von TetR Aptamer kurz in pGL4.10_InII in Luci
Rev_pGL4 luci ExI (UH IntronI)	ctaaccaatccagccagtagctgtag tcggtctgtctatc	Klonierung von Introns aus pMA in pGL4.10
Rev_pMA ExII (UH Tet Apt mut)	cccagaacaagctgcttgatacgcaact actgtgtgttttg	Klonierung von TetR Apt mut in pMA_CMV i6u555 TetR Apt 5'SS
Rev_pMA ExII (UH Tet Apt mut)	cccagaacaagctgcttgatacgcaact actgtgtgttttg	Klonierung von TetR Apt mut in pMA
Rev_pMA ExII strong SS UH Apt kurz	ggctctgtgatgaccataacatgctgctg atcactcacctctgtgttttggtg	Klonierung von TetR Aptamer kurz in pGL4.10_ExII + InII vor Luci
Rev_pMA InII (UH ExIII luci)	gggtacatgctttggaagccctgaaaa aagaattatgattattgc	Klonierung von InI + ExII + InII in Luziferase
Rev_RcRE pck30 + XhoI	catctactcgagcacataaacatctcaat gctttac	Primer für Amplifikation von mutierter Region
Rev_SFV 3'UTR	gcgttgcccgattcattaatg	Amplifikation von bestellten Theohh in 3'-UTR Konstrukten
Rev_SFV AUG in Tc (ÜH GFP)	tcctcgcccttgctcaccatctaggtggtct gtattcttc	Klonierung von AUG in Tc
Rev_SFV hinter GFP/XmaI	cgttgctgtagggatgtaattc	Klonierung von Tc an AUG und AUG in Tc
Rev_SFV mCherry statt GFP + XmaI	ttgttgcccggttactgtacagctcgctcc atg	Klonierung von mCherry in pSFV-RD

Rev_SFV sg neu	ggcccttagctgtgtattaac	Klonierung von AUG in Tc
Rev_SFV SG/GFP	ctcctcgcccttgctcac	Amplifikation von bestellten Tc vor AUG-Konstrukten
Rev_SFV Sgmut tc an ATG	ctcctcgcccttgctcaccatggacctag gtggtctgtattc	Klonierung von Tc an AUG
Rev_TetR mit SG4	agatccaccgcctcctgag	Klonierung von TetR
Rev_TetR+SG +Agel	ttgttgaccggtttaagatccaccgcctcc tgag	Klonierung von TetR
Rev2_i6u555 ExII + SG4 + ApaI	caacaagggcccttctaattgttttgcat cttctccaccgcctcctgactgtgtgttg gttgtttgg	Klonierung von ExII aus pMA-i6u55 vor luci
Seq_pWHE211 in CMV	gcagagctcgtttagtgaac	Sequenzierung von pWHE211

3.1.7 Verwendete Plasmide

Tabelle 3-7: Verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pSP64_RcRE pck30	pSP64-Derivat, RcRE pck30 unter T7-Promotor, AmpR	Diplomarbeit Janina Langner
pHelper S	SP (außer Capsid) unter SP6- Promotor, AmpR	Andres Merits, Institute of Technology, Tartu, Estonia
pHelper C	Capsid unter SP6-Promotor, AmpR	Andres Merits, Institute of Technology, Tartu, Estonia
pSFV4-RD-eGFP	SFV-Genom mit eGFP statt SP unter SP6-Promotor, AmpR	Andres Merits, Institute of Technology, Tartu, Estonia
pHIVgag delta U3 RIII	HIVgag flankiert von LTR auf HIV mit Exportsequenz, AmpR	Margin-Lachmann <i>et al.</i> ¹¹²
pGL4.10	Firefly Luziferase ohne Promotor, AmpR	Promega, USA
pGL4.75	<i>Renilla</i> Luziferase unter CMV-Promotor, AmpR	Promega, USA
pWHE211-TetR-CTCF	TetR-CTCF unter CMV-Promotor, AmpR	Christian Berens, Universität Erlangen
pMA_i6u555	Minigen pMA, AmpR	Lawrence Chasin, Columbia University, New York, USA
pMA_i6u555 Tc2	Minigen pMA, AmpR	Alexander Wittmann, Post-Doc, TU Darmstadt

1450_pGL3-Promotor_mCherry	pGL3-Derivat, mCherry unter SV40-Promotor, AmpR	Alexander Wittmann, Dissertation, Goethe Universität Frankfurt
pGFP Minigen	Minigen aus GFP, KanR	Wang <i>et al.</i> ¹¹⁶

3.1.8 Konstruierte Plasmide

Tabelle 3-8: Konstruierte Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pGL4.10_CMV	Firefly-luziferase CMV-Promotor, AmpR	Kap. 4.3.5.1.3
pGL4.10_CMV ExII + InII + Tet Apt 5'SS vor luci	Firefly-luziferase CMV - Promotor, AmpR	Kap. 4.3.5.1.3
pGL4.10_CMV ExII + InII strong SS + Tet Apt 5'SS vor luci	Firefly-luziferase CMV - Promotor, AmpR	Kap. 4.3.5.1.3
pGL4.10_CMV ExII + InII vor luci	Firefly-luziferase CMV - Promotor, AmpR	Kap. 4.3.5.1.3
pGL4.10_CMV ExII vor luci	Firefly-luziferase CMV - Promotor, AmpR	Kap. 4.3.5.1.3.1
pGL4.10_CMV In II + Tet Apt kurz 5' SS in luci	Firefly-luziferase CMV - Promotor, AmpR	Kap. 4.3.5.5.1
pGL4.10_CMV In II + Tet Apt kurz hinter SS in luci	Firefly-luziferase CMV - Promotor, AmpR	Kap. 4.3.5.5.1
pGL4.10_CMV In II + Tet Apt kurz in SS in luci	Firefly-luziferase CMV - Promotor, AmpR	Kap. 4.3.5.5.1
pGL4.10_CMV In II + Tet Apt sehr kurz 5'SS in luci	Firefly-luziferase CMV - Promotor, AmpR	Kap. 4.3.5.5.1
pGL4.10_CMV In II strong SS + Tet Apt kurz 5'SS in luci	Firefly-luziferase CMV - Promotor, AmpR	Kap. 4.3.5.5.1
pGL4.10_CMV In II strong SS + Tet Apt sehr kurz 5'SS in luci	Firefly-luziferase CMV - Promotor, AmpR	Kap. 4.3.5.5.1
pGL4.10_CMV InI + ExII + InII i4u Tet Apt 5'SS in luci	Firefly-luziferase CMV - Promotor, AmpR	Kap. 4.3.5.1.4
pGL4.10_CMV InI + ExII + InII i6u in luci	Firefly-luziferase CMV - Promotor, AmpR	Kap. 4.3.5.1.4
pGL4.10_CMV InI + ExII + InII i6u Tet Apt 5'SS in luci	Firefly-luziferase CMV - Promotor, AmpR	Kap. 4.3.5.1.4
pGL4.10_CMV InI + ExII + InII i6u Tet Apt kurz 5'SS in luci	Firefly-luziferase CMV - Promotor, AmpR	Kap. 4.3.5.1.4
pGL4.10_CMV InI + ExII + InII i6u Tet Apt lang 5'SS in luci	Firefly-luziferase CMV - Promotor, AmpR	Kap. 4.3.5.1.4
pGL4.10_CMV InI + ExII + InII i6u Tet Apt mut 5'SS in luci	Firefly-luziferase CMV - Promotor, AmpR	Kap. 4.3.5.1.4
pGL4.10_CMV InI + In II + Tet Apt 5'SS in luci	Firefly-luziferase CMV - Promotor, AmpR	Kap. 4.3.5.1.2
pGL4.10_CMV InI + In II in luci	Firefly-luziferase CMV - Promotor, AmpR	Kap. 4.3.5.1.2
pGL4.10_CMV InI + In II strong SS + Tet Apt 5'SS in luci	Firefly-luziferase CMV - Promotor, AmpR	Kap. 4.3.5.1.2
pGL4.10_CMV InII + Tet Apt 5'SS in luci	Firefly-luziferase CMV - Promotor, AmpR	Kap. 4.3.5.1.2
pGL4.10_CMV InII in luci	Firefly-luziferase CMV - Promotor, AmpR	Kap. 4.3.5.1.2

Material und Methoden

pHIV gag deltaU3 RIII_RcRE pck30	HIVgag flankiert von LTR auf HIV mit Exportsequenz RcREpck30, AmpR	Kap. 4.1.2.3.1
pHIV gag deltaU3 RIII_RcRE pck30 M1	HIVgag flankiert von LTR auf HIV mit Exportsequenz RcREpck30 mit Mutation, AmpR	Kap. 4.1.2.3.1
pHIV gag deltaU3 RIII_RcRE pck30 M2	HIVgag flankiert von LTR auf HIV mit Exportsequenz RcREpck30 mit Mutation, AmpR	Kap. 4.1.2.3.1
pHIV gag deltaU3 RIII_RcRE pck30 M2&M5	HIVgag flankiert von LTR auf HIV mit Exportsequenz RcREpck30 mit Mutation, AmpR	Kap. 4.1.2.3.1
pHIV gag deltaU3 RIII_RcRE pck30 M3	HIVgag flankiert von LTR auf HIV mit Exportsequenz RcREpck30 mit Mutation, AmpR	Kap. 4.1.2.3.1
pHIV gag deltaU3 RIII_RcRE pck30 M3&M5	HIVgag flankiert von LTR auf HIV mit Exportsequenz RcREpck30 mit Mutation, AmpR	Kap. 4.1.2.3.1
pHIV gag deltaU3 RIII_RcRE pck30 M3,M4&M5	HIVgag flankiert von LTR auf HIV mit Exportsequenz RcREpck30 mit Mutation, AmpR	Kap. 4.1.2.3.1
pHIV gag deltaU3 RIII_RcRE pck30 M4	HIVgag flankiert von LTR auf HIV mit Exportsequenz RcREpck30 mit Mutation, AmpR	Kap. 4.1.2.3.1
pHIV gag deltaU3 RIII_RcRE pck30 M5	HIVgag flankiert von LTR auf HIV mit Exportsequenz RcREpck30 mit Mutation, AmpR	Kap. 4.1.2.3.1
pMA_CMV 6u555 Tet Apt mut 5'SS	Minigen pMA i6u555 CMV - Promotor, AmpR	Kap. 4.3.3.2.2
pMA_CMV i255	Minigen pMA i255 CMV - Promotor, AmpR	Kap. 4.3.3.1
pMA_CMV i255 Tet Apt 5'SS	Minigen pMA i255 CMV - Promotor, AmpR	Kap. 4.3.3.2.1
pMA_CMV i255 Tet Apt lang 5'SS	Minigen pMA i255 CMV - Promotor, AmpR	Kap. 4.3.3.2.1
pMA_CMV i4u555	Minigen pMA i4u555 CMV - Promotor, AmpR	Kap. 4.3.3.1
pMA_CMV i4u555 Tet Apt 5'SS	Minigen pMA i4u555 CMV - Promotor, AmpR	Kap. 4.3.3.2.1
pMA_CMV i4u555 Tet Apt lang 5'SS	Minigen pMA i4u555 CMV - Promotor, AmpR	Kap. 4.3.3.2.1
pMA_CMV i6u555 strong 5' SS Tet Apt 5'SS	Minigen pMA i6u555 CMV - Promotor, AmpR	Kap. 4.3.3.3.1
pMA_CMV i6u555 Tet Apt 5'SS	Minigen pMA i6u555 CMV-Promotor, AmpR	Kap. 4.3.3.2.1
pMA_CMV i6u555 Tet Apt kurz 5'SS	Minigen pMA i6u555 CMV-Promotor, AmpR	Kap. 4.3.3.3.1

Material und Methoden

pMA_CMV i6u555 Tet Apt lang 5'SS	Minigen pMA i6u555 CMV-Promotor, AmpR	Kap. 4.3.3.2.1
pMinigenWang_TetApt in Exon II	GFP Minigen mit TetR Apt in Exon 2, KanR	Kap. 4.3.4.1
pSFV4-RD-eGFP_SG mut-Tc an AUG	SFV nSP RD mut in nSP1 eGFP statt SP subgenomischer Promotor mutiert und dubliziert, AmpR	Kap. 4.2.2.1
pSFV4-RD-eGFP SG mut	SFV nSP RD mut in nSP1 eGFP statt SP subgenomischer Promotor mutiert und dubliziert, AmpR	Kap. 4.2.1.1
pSFV4-RD-eGFP_hh in UTR	SFV nSP RD mut in nSP1 eGFP statt SP, AmpR	Kap. 4.2.4.2
pSFV4-RD-eGFP_hhi in UTR	SFV nSP RD mut in nSP1 eGFP statt SP, AmpR	Kap. 4.2.4.2.1
pSFV4-RD-eGFP_SG mut-2 Tc vor AUG	SFV nSP RD mut in nSP1 eGFP statt SP subgenomischer Promotor mutiert und dubliziert, AmpR	Kap. 4.2.2.2
pSFV4-RD-eGFP_SG mut-AUG in Tc	SFV nSP RD mut in nSP1 eGFP statt SP subgenomischer Promotor mutiert und dubliziert, AmpR	Kap. 4.2.2.1
pSFV4-RD-eGFP_SG mut-Tc vor AUG	SFV nSP RD mut in nSP1 eGFP statt SP subgenomischer Promotor mutiert und dubliziert, AmpR	Kap. 4.2.1.1
pSFV4-RD-eGFP_SG mut-Tc vor Sg	SFV nSP RD mut in nSP1 eGFP statt SP subgenomischer Promotor mutiert und dubliziert, AmpR	Kap. 4.2.1.1
pSFV4-RD-eGFP_SG mut-Tc-AGA	SFV nSP RD mut in nSP1 eGFP statt SP subgenomischer Promotor mutiert und dubliziert, AmpR	Kap. 4.2.1.1
pSFV-RD-mCherry_SGmut	SFV nSP RD mut in nSP1 mCherry statt SP subgenomischer Promotor mutiert und dubliziert, AmpR	Kap. 4.2.3.3.1
pSP64_Ds-GGAA	pSP64-Derivat, Haarnadelstruktur unter T7-Promotor, AmpR	Kap. 4.1
pSP64_Hp-AAGG	pSP64-Derivat, Haarnadelstruktur unter T7-Promotor, AmpR	Kap. 4.1
pSP64_Hp-GGA	pSP64-Derivat, Haarnadelstruktur unter T7-Promotor, AmpR	Kap. 4.1
pSP64_Hp-GGAA	pSP64-Derivat, Haarnadelstruktur unter T7-Promotor, AmpR	Kap. 4.1
pSP64_Hp-negC	pSP64-Derivat, Haarnadelstruktur unter T7-Promotor, AmpR	Kap. 4.1

pSP64_Hp-purinrich	pSP64-Derivat, Haarnadelstruktur unter T7-Promotor, AmpR	Kap. 4.1
pSP64_RcRE pck30 M1	pSP64-Derivat, RcRE pck30 mit Mutation unter T7-Promotor, AmpR	Kap. 4.1.2.1
pSP64_RcRE pck30 M2	pSP64-Derivat, RcRE pck30 mit Mutation unter T7-Promotor, AmpR	Kap. 4.1.2.1
pSP64_RcRE pck30 M2&M5	pSP64-Derivat, RcRE pck30 mit Mutation unter T7-Promotor, AmpR	Kap. 4.1.2.1
pSP64_RcRE pck30 M3	pSP64-Derivat, RcRE pck30 mit Mutation unter T7-Promotor, AmpR	Kap. 4.1.2.1
pSP64_RcRE pck30 M3&M5	pSP64-Derivat, RcRE pck30 mit Mutation unter T7-Promotor, AmpR	Kap. 4.1.2.1
pSP64_RcRE pck30 M3,M4&M5	pSP64-Derivat, RcRE pck30 mit Mutation unter T7-Promotor, AmpR	Kap. 4.1.2.1
pSP64_RcRE pck30 M4	pSP64-Derivat, RcRE pck30 mit Mutation unter T7-Promotor, AmpR	Kap. 4.1.2.1
pSP64_RcRE pck30 M5	pSP64-Derivat, RcRE pck30 mit Mutation unter T7-Promotor, AmpR	Kap. 4.1.2.1
pWHE211_NLS-TetR	pWHE211 Derivat, TetR mit NLS CMV-Promotor, AmR	Kap. 4.3.1.1
pWHE211_NLS-TetR-ASF	pWHE211 Derivat, TetR-ASF Fusionsprotein mit NLS CMV-Promotor, AmR	Kap. 4.3.1.1
pWHE211_NLS-TetR-hnRNP A1	pWHE211 Derivat, TetR-ASF Fusionsprotein mit NLS CMV-Promotor, AmR	Kap. 4.3.1.1
pWHE211_TetR ΔCMV	pWHE211 Derivat, TetR mit NLS ohne CMV-Promotor, Auffüllplasmid, AmpR	Kap. 4.3.1.2

3.1.9 Verwendete Stämme

Tabelle 3-9: Verwendete Stämme

Stämme	Genetische Marker
<i>E.coli</i> DH5α	<i>hsdR17</i> (rK-, mK-), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>supE44</i> , <i>thi</i>
<i>E.coli</i> Top 10	<i>F- mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZ M15 lacX74 recA1 ara 139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>

3.2 Medium, Puffer und Lösungen

Alle Puffer wurden mit Millipore (MQ)-Wasser angesetzt und autoklaviert oder steril filtriert.

3.2.1 Medien für prokaryotische Zellen

Tabelle 3-10: Zusammensetzung LB-Medium

LB-Medium

10 g/l Trypton
5 g/l Hefeextrakt
10 g/l NaCl

Nach dem Autoklavieren wurden 100 µg/ml Ampicillin in 70% Ethanol als fakultativer Mediumzusatz nach Erkalten des Flüssigmediums bzw. nach Abkühlen auf 50°C der Plattenmedien zugegeben. Wie in Sambrook *et. al*¹¹⁷ beschrieben wurde das Antibiotikum als 1000-fach konzentrierte Stammlösung hergestellt und bei -20°C gelagert.

3.2.2 Medien für eukaryotische Zellen

3.2.2.1 HeLa & HEK293

Tabelle 3-11: Zusammensetzung des Mediums für humane Zellen

HeLa & HEK293 Medium

500 ml DMEM
10% (v/v) FCS
1x Penicillin Streptomycin
1 mM Natrium-Pyruvat

3.2.2.2 BHK21

Tabelle 3-12: Zusammensetzung der Medien für Hamsterzellen

Standard Medium

500 ml GMEM
10% (v/v) FCS
2% (v/v) *Tryptose phosphate broth*
1x Penicillin Streptomycin

NS-Medium

500 ml GMEM
 10% (v/v) FCS
 0,2% (w/v) BSA
 2% (v/v) *Tryptose phosphate broth*
 1x Penicillin Streptomycin
 20 mM HEPES pH 7,2

2% Medium

500 ml GMEM
 2% (v/v) FCS
 2% (v/v) *Tryptose phosphate broth*
 1x Penicillin Streptomycin
 20 mM HEPES pH 7,2 (autoklaviert)

3.2.2.3 C6/36

Tabelle 3-13: Zusammensetzung des Mediums für C6/36 Mosquitozellen

C6/36 Medium

500 ml L-15 Medium
 10% (v/v) FCS
 0,3% *Tryptose phosphate broth*
 1x Penicillin Streptomycin

Das FCS wurde vor der Verwendung für 45 min im Wasserbad bei 65°C hitzeinaktiviert.

3.2.3 Puffer

Tabelle 3-14: Zusammensetzung des TNE-Puffers

TNE-Puffer

50 mM Tris- HCl pH 7,4
 100 mM NaCl
 0,5 mM EDTA

autoklaviert

3.2.3.1 Gelelektrophorese-Puffer

Tabelle 3-15: Zusammensetzung der Puffer für die Gelelektrophorese

50x TAE

400 mM Tris	
200 mM Essigsäure	
1 mM EDTA	
pH 8,3 (mit HCl eingestellt)	autoklaviert

10x TB

0,89 M Tris	
0,89 M Borsäure	autoklaviert

10x TBE

0,89 M Tris	
0,89 M Borsäure	
0,01 M EDTA	
pH 8,3	autoklaviert

2x RNA-Ladepuffer denaturierend (Formamid)

Formamid
25 mM EDTA
0,01% (w/v) Bromphenolblau
0,01% (w/v) Xylencyanol

RNA-Ladepuffer nativ (für EMSA)

1x TB	
10% (v/v) Glycerin	steril filtriert

Shiftpuffer Tris (10x)

500 mM Tris-HCl pH 7,5
100 mM MgCl ₂
250 mM NaCl
250 µg/ml Hefe tRNA

4x Sammelgelpuffer (für Protein-Gele)

0,5 M Tris, pH 6,8
0,4% (v/v) SDS

4x Trenngelpuffer (für Protein-Gele)

1,5 M Tris, pH 8,8
0,4% (v/v) SDS

Laufpuffer

25 mM Tris pH 8,3
0,1% (v/v) SDS
192 mM Glycin

4x Protein-Ladepuffer

15% (v/v) β -Mercaptoethanol
4% (v/v) SDS
1,5% (w/v) Bromphenolblau
50% (v/v) Glycerin

3.2.4 Gele

Tabelle 3-16: Zusammensetzung der Gele

Agarosegel

1%, 3% (w/v) Agarose
Gelöst in 1x TAE
autoklaviert

Polyacrylamid denaturierend für RNA

8M Harnstoff
1x TBE
6%, 8%, 12% (v/v) Acrylamid
steril filtriert

Polyacrylamid nativ für RNA

6% Acrylamid
10% Glycerin
1xTB

SDS-Gel nach Lämmli ¹¹⁸

Sammelgel 4,5 %	4,5% Acrylamid
	1x Gelpuffer

Trenngel 10%	10% Acrylamid
	1x Gelpuffer

Die Polyacrylamidgele wurde durch Zugabe von 0,1% (v/v) APS und 0,01% (v/v) TEMED auspolymerisiert.

3.2.5 Westernblot Puffer

Transferpuffer

10 mM NaHCO ₃	
3 mM Na ₂ CO ₃	Frisch angesetzt und bis zur
20% (v/v) Methanol	Verwendung bei 4°C lagern

Blockierlösung

2% ECL Advance TM
1x TBST

10x TBS

200 mM Tris
1,5 M NaCl
pH 7,6 (mit HCl eingestellt)

1x TBST

0,1% (v/v) Tween 20
1x TBS

3.3 Methoden

3.3.1 Allgemeine Methoden

Allgemein angewandte und bereits in der Literatur beschriebene Methoden sind in Tabelle 3-17 aufgelistet.

Tabelle 3-17: Allgemeine bereits beschriebene Methoden

Methoden	Referenz
Ethidiumbromidfärbung von DNA	Sambrook <i>et al.</i> ¹¹⁹
Gelelektrophorese von DNA	Sambrook <i>et al.</i> ¹¹⁹
Gelelektrophorese von Proteinen	Laemmli ¹¹⁸
Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	Hanahan <i>et al.</i> ¹²⁰
Ligation von DNA-Fragmenten	Sambrook <i>et al.</i> ¹¹⁹
Polymerasekettenreaktion	Landt <i>et al.</i> ¹²¹
Proteinbestimmung	Bradford ¹²²
Restriktionsendonukleasespaltung von DNA	Sambrook <i>et al.</i> ¹¹⁹
Sequenzierung von DNA nach der Kettenabbruchmethode	Sanger <i>et al.</i> ¹²³
Transformation von <i>E. coli</i>	Hanahan <i>et al.</i> ¹²⁰
Western Blot	Towbin <i>et al.</i> ¹²⁴

3.3.2 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient zum Nachweis und zur Größenabschätzung von Nukleinsäuren und Proteinen. DNA wird meist über Agarosegele analysiert und RNA über Polyacrylamidgele, bei Proteinen werden SDS-Gele (Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese) verwendet.

Hierbei wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren entlang des angelegten Spannungsfeldes von der Kathode zur Anode. Durch das Maschenwerk des Gels werden die Nukleinsäuren der Größe nach aufgetrennt.

Zur Detektion der Nukleinsäuren im Gel wurden die Gele in einem Ethidiumbromidbad gefärbt und unter UV-Licht (254 nm) fotografiert.

Präparative DNA-Gele wurden niedriger-energetischem UV-Licht mit einer längeren Wellenlänge von 366 nm ausgesetzt, um durch UV-Licht erzeugte DNA-Schäden möglichst gering zu halten.

Präparative RNA-Gele wurde ohne Färbung im Ethidiumbromidbad auf reflektorischen Glasplatten mit langwelligem UV-Licht bestrahlt. Dort wo Banden im Gel sichtbar waren, war durch die Absorption der Basen keine Reflexion des UV-Lichtes beobachtbar (*UV-Shadow*).

Proteine wurden über SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) aufgetrennt. Hierbei überlagert das negativ geladene Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) die Eigenladung des Proteins, sodass alle Proteine gleich stark negativ geladen sind und im Gel nur nach der Größe aufgetrennt werden.

3.3.2.1 Agarosegele

Je nach Größe der zu analysierenden DNA wurden 1- oder 3%ige Agarosegele in 1x TAE-Puffer verwendet. Die Gele wurden mit einer Schichtdicke von 3-4 mm auf rechteckige Kunststoffplatten gegossen. Zur Formung von Ladetaschen wurde ein Kunststoffkamm in die noch dickflüssige, heiße Agarose gesteckt. Nach Erkalten des Gels wurde der Kamm herausgezogen und das Gel in eine mit 1x TAE-Puffer befüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die mit DNA-Ladepuffer versetzten DNA-Lösungen wurden in die entsprechenden Gelaschen pipettiert und bei 110 - 120 V aufgetrennt.

3.3.2.1.1 Elution von DNA aus Agarosegelen

Bei präparativem DNA-Gelen wurden die benötigten Banden unter Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (366 nm) mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Elution erfolgte mit dem Gel Extraction Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers.

3.3.2.2 Polyacrylamidgele

Je nach Größe der zu analysierenden RNA wurden 6-, 8- oder 12%ige Polyacrylamidgele (Kap. 3.2.3.1) in 1x TBE-Puffer für denaturierende Gele oder 1x TB-Puffer für native Gele verwendet. Die Proben wurden je nach Länge der RNA vor dem Auftragen 1 - 3 min bei 95°C inkubiert. In kleinen denaturierenden Gelen, welche neben Polyacrylamid noch 8 M Harnstoff enthielten, wurde die RNA bei 160 - 180 V aufgetrennt. Bei nativen Gelen wurde nur eine elektrische Leistung von 1 W angelegt.

3.3.2.3 SDS-PAGE

Für die denaturierenden Proteingele wurden 4,5%ige Sammelgele und 10%ige Trenngele eingesetzt. Es wurden ca. 8 µg Protein mit Ladepuffer versetzt und zum Denaturieren vor dem Auftragen 3 - 5 min bei 95°C inkubiert. Im Sammelgel wurden 20 mA angelegt und im Trenngel 50 mA.

3.3.3 Methoden zur Behandlung prokaryotischer Zellen

3.3.3.1 Anzucht in Flüssigmedium und Ernte

Zur Anzucht in Flüssigmedien wurden Schikanekolben bzw. Reagenzgläser mit LB-Medium gefüllt und nach Abkühlen mit den fakultativen Medienzusätzen versetzt. Übernachtskulturen wurden mit einer einzelnen Kolonie beimpft und über Nacht bei 37°C in einem Luftschüttler mit 150 rpm inkubiert. Für die QIAquick Spin Miniprep wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 13000 rpm über eine Minute geerntet.

Zur Aufreinigung größerer Plasmidmengen wurde eine Übertagkultur mit einer einzelnen Kultur beimpft und damit eine Übernachtskultur 1:100 beimpft und bei 37°C und 150 rpm über Nacht in einem Luftschtüttler inkubiert. Geerntet wurden die Zellen durch das Zentrifugieren der Zellkulturen für 30 min 6000 g.

3.3.3.2 Anzucht auf Festmedium und Aufbewahrung

Die Transformationsansätze wurden in verschiedenen Volumina auf LB-Agarplatten mithilfe eines Drigalskispatels ausplattiert. Zur Vereinzelung von Kolonien wurden einzelne Kolonien gepickt und mit Hilfe von sterilen Holzstäbchen auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Die LB-Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert und bei 4°C gelagert.

3.3.3.3 Herstellung CaCl_2 -kompetenter Zellen

Für die Herstellung von CaCl_2 -kompetenten *E. coli* DH5 α bzw. *E. coli* Top10 wurden 4 ml einer Übernachtskultur genutzt, um 1 l vorgewärmtes LB anzupflegen. Die Zellen wuchsen bis zu einer OD_{600} von 0,4 – 0,5. Die Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert und dann bei 6000 rpm für 5 min bei 4°C geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einem halbem Kulturvolumen kaltem 0,1 M CaCl_2 durch schwenken resuspendiert und erneut für 5 min bei 4°C mit 6000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 ml kaltem 0,1 M CaCl_2 resuspendiert und mind. 1 h auf Eis inkubiert. Danach wurde Glycerin mit einer Endkonzentration von 15 % (v/v) zugegeben und die Zellen nach dem Aliquotieren in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.3.3.4 Transformation CaCl_2 -kompetenter Zellen

Zur Transformation wurde ein Ligationsansatz (Kap. 3.3.6.2) mit 100 μl langsam auf Eis aufgetauten CaCl_2 -kompetenten Zellen versetzt und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde anschließend für 90 sec einem Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad ausgesetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Transformationsansatz mit auf 37°C vorgewärmtem LB-Flüssigmedium auf 1 ml aufgefüllt und für 30 min im Thermomixer bei 950 rpm und 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 μl des Ansatzes ausplattiert. Die restlichen Zellen wurden 5 min bei 13000 rpm abzentrifugiert, in 100 μl LB-Flüssigmedium aufgenommen und auf einer weiteren LB-Platte ausgebracht. Die LB-Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.3.4 Methoden zur Behandlung eukaryotischer Zellen

3.3.4.1 Kultivierung

Die verwendeten HeLa-Zellen sind adhärent wachsende, humane Epithelzellen, die von einem stark proliferierenden Zervixkarzinom abstammen. Die Zellen wurden bei 37°C unter

5% CO₂ in 20 ml Medium (Kap. 3.2.2.1) in 15 cm Gewebekultur - Flaschen kultiviert. Zwei bis dreimal wöchentlich wurden die zu 80 - 90% konfluenten Zellen gesplittet. Hierzu wurden die Zellen 5 min bei 37°C mit 2 ml Trypsin-EDTA inkubiert und nachdem sich die Zellen abgelöst hatten mit 6 ml Medium versetzt. Die Zellen wurden mit dem Cell Counter TC10 ausgezählt. Für die Lipofektion zur Präparation von RNA wurden 1·10⁵ HeLa- Zellen in 12-*well*-Platten in 1 ml DMEM ausgesät. Für die Luziferase-Messungen wurden HEK293 Zellen verwendet. Dies sind adhärent wachsende, humane, embryonale Nierenzellen, die Teile der DNA von Adenovirus 5 in ihr Genom integriert haben und somit auf unbegrenzte Zeit in Zellkultur wachsen.

Hier wurden am Tag vor der Lipofektion 1,1·10⁵ Zellen in 1 ml DMEM pro *well* ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

3.3.4.2 Zellviabilitätsüberprüfung (MTT-Test)

Zur Untersuchung der Zytotoxizität von Theophyllin wurde in BHK21 und in C6/36 Mosquitozellen mittels eines MTT-Tests die Zellviabilität überprüft. Dieser Test basiert auf der Umsetzung von gelbem Tetrazolimsalz (MTT; 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolimbromid) zu violetter Formazan durch die mitochondrialen Dehydrogenasen.

Für den MTT-Test wurden die Zellen in 12-*well*-Platten ausgesät und am nächsten Tag, nach Waschen mit PBS, wurde das Medium zu Theophyllin haltigem Medium gewechselt. Die Zellen wurden dann 24 h unter Standardbedingungen inkubiert und je *well* mit 100 µl MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS) versetzt. Die Zellen wurden erneut 2 h inkubiert und danach mit PBS gewaschen. Für die Zellyse wurden 500 µl Lysepuffer pro *well* eingesetzt, welcher aus 800 µl 2,5 M HCl, 200 µl MQ und 49 ml Isopropanol bestand. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption des Formazans bei 550 nm gemessen, hierzu wurde der Lyseansatz mit 500 µl Isopropanol aufgefüllt.

Zur Auswertung wurde die Absorption der Zellen ohne Theophyllin auf 100 % lebend gesetzt und die restlichen Werte darauf normiert.

3.3.4.3 Lipofektion

Die Lipofektion wird genutzt um humane Zellen mit DNA beladenen Lipidtröpfchen zu transfizieren. Für die Minigene wurden je 50 ng des Minigens, 100 ng des TetR exprimierenden Vektors pWHE211-NLS-TetR und 850 ng des Auffüllplasmids pWHE211-TetRΔCMV, bei dem der CMV-Promotor deletiert wurde, transfiziert. Für die Lipofektion wurden 2 µl Lipofektamin 2000 mit 48 µl Opti-MEM versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde die DNA mit 50 µl Opti-MEM versetzt. Die beiden Ansätze wurden vereinigt und für mind. 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die HeLa-Zellen wurden zwei Mal mit je 1 ml 1x PBS pro *well* gewaschen und mit 500 µl

Opti-MEM versetzt. 100 µl der Transfektionsmischung wurden zu jedem *well* dazu gegeben und die Zellen danach für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Für die Luziferase-Messungen wurden 25 ng der Aptamerkonstrukte auf pGL4.10_CMV, welcher für die Firefly Luziferase codiert, 25 ng von pGL 4.75, welcher für die *Renilla* Luziferase codiert, und 50 ng des TetR exprimierenden Vektors pWHE211_NLS-TetR sowie 900 ng des Auffüllplasmids pWHE211_TetR-CMV transfiziert. Hierzu wurde 1 µl Lipofektamin 2000 mit 49 µl Opti-MEM versetzt und für mind. 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, ansonsten wurde die Lipofektion wie oben bereits für das Minigen beschrieben durchgeführt.

3.3.4.4 Infektion

3.3.4.4.1 Herstellung viraler Replikonpartikel

Zur Herstellung viraler Partikel wurden die viralen Plasmide mit *SpeI* linearisiert und über eine Phenol-Chloroform-Extraktion (Kap.3.3.7.5) aufgereinigt. Für die *in vitro* Transkription der linearisierten Plasmide wurde das mMMESSAGE mMACHINE SP6 Kit (Life Technologies, USA) nach Angaben des Herstellers genutzt. Für die Transformation der BHK21 Zellen wurden je 1 Mio. Zellen in 800 µl kaltem PBS aufgenommen und mit 7 µl des *in vitro* Transkriptionsansatzes der Helferplasmide pHelper S und pHelper C und 10 µl des SFV-Konstrukts versetzt. Der Ansatz wurde in vorgekühlte 0,4 cm Küvetten geben und mit zwei Pulsen á 850 V und 25 µF elektroporiert. Die Zellen wurden danach in GMEM Standardmedium (Kap. 3.2.2.2) ohne Antibiotika in einer 10 cm Zellkulturschale geben und für 48 h bei 28°C und 5% CO₂ inkubiert. Die transformierten viralen Plasmide führten nun zur Expression viraler Gene und zur Synthese von viralen Partikeln, welche eine Zelllyse hervorrufen. Die viralen Partikel befanden sich folglich im Zellüberstand. Zum Ernten der viralen Partikel wurde das Medium der transformierten Zellen abgenommen und 15 min abzentrifugiert, um Zelltrümmer zu sedimentieren. Der Überstand wurde steril filtriert, in Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und mit 1,5 ml 20% Sucrose in TNE - Puffer unterschichtet. Die viralen Partikel wurden dann durch 3 h Ultrazentrifugation bei 37500 rpm mit dem Rotor sw41Ti pelletiert. Das Pellet wurde durch einminütiges Vortexen und anschließende Inkubation über Nacht bei 4°C in 200 µl TNE - Puffer gelöst und anschließend aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.3.4.4.2 Titerbestimmung

Zur Bestimmung des Titers und damit der infektiösen Einheiten pro ml (iU/ml) VRP-Lösung wurde das FACS genutzt. Hierzu wurden die zu infizierenden Zellen einen Tag zuvor in 6-*well*-Platten ausgesät. Nun wurden 5 µl der geernteten VRP-Lösung (Kap. 3.3.4.4.1) in

495 µl PBSA (PBS + 0,75% BSA) für C6/ 36 Zellen bzw. NS-Medium (Kap. 3.2.2.2) für BHK21 verdünnt (10^{-2} -Verdünnung). Für die weiteren Verdünnungen wurden 50 µl der 10^{-2} -Verdünnung mit 450 µl PBSA versetzt (10^{-3}) bzw. 50 µl der 10^{-3} -Verdünnung wurden mit 450 µl PBSA versetzt (10^{-4}). Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden 400 µl der Verdünnung auf die Zellen gegeben und für 1 h im Brutschrank inkubiert. Hierbei wurden die Zellen alle 10 – 15 min geschwenkt, damit die VRP-Verdünnung auf allen Zellen verteilt wird. Danach wurde die VRP-Verdünnung abgesaugt und jedes *well* mit 2 ml C6/36-Medium bzw. 2% Medium versetzt und für 23 h im Brutschrank inkubiert.

Nach 24 h wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann mit 500 µl Trypsin-EDTA je *well* versetzt. Nach kurzer Inkubationszeit, in der sich die Zellen ablösen, wurden 2 ml Medium zugefügt und der Ansatz in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 10 min bei 1000 xg zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 700 µl PBS aufgenommen und die GFP Fluoreszenz am FACS analysiert. Mit dem Anteil an fluoreszierenden Zellen bezogen auf die Gesamtmenge an intakten Zellen wurde nach folgender Formel der Titer berechnet.

$$\text{Titer } \left[\frac{iU}{ml} \right] = \text{Zellzahl} \cdot \text{Anteil fluoreszente Zellen} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \\ \cdot \text{Normierungsfaktor auf 1 ml}$$

$$\text{Normierungsfaktor auf 1 ml} = \frac{1 \text{ ml}}{\text{Volumen eingesetzt für Infektion}} = \frac{1000 \mu l}{400 \mu l} = 2,5$$

3.3.4.4.3 Infektion zur Analyse von RNA-Schaltern

Für die Analyse der Schalter mussten die Zellen zuerst mit VRP infiziert werden, hierzu wurden die Zellen einen Tag vor der Infektion in 12-*well*-Platten ausgesät. Danach wurden die Zellen mit einer MOI von 5 für Western Blots bzw. mit einer MOI von 1 für Fluoreszenzmessungen und 0,1 für die mCherry VRP infiziert. Hierzu wurde die entsprechende Menge an VRP in 200 µl NS-Medium (Kap. 3.2.2.2) für BHK21 bzw. PBSA (PBS + 0,75% BSA) für C6/36 Zellen pro zu infizierendem *well* aufgenommen. Die Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen und danach mit 200 µl der VRP-Lösung versetzt. Die Zellen wurden für 1 h im Brutschrank inkubiert und alle 10 – 15 min geschwenkt, damit die VRP-Verdünnung auf allen Zellen gleichmäßig verteilt wird. Danach wurde die VRP-Lösungen abgesaugt und jedes *well* mit 1 ml 2% Medium bzw. C6/36-Medium versetzt und für 1 h im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Erholungsphase wurde den Medien 500 µl Tetrazyklin-Lösung (150 µM) oder Theophyllin (7,5 mM) gelöst in Medium bzw. reines Medium für die Werte ohne Zusätze zugegeben. Die Zellen wurden dann weitere 22 h inkubiert und somit 24 h nach Infektionsbeginn analysiert.

3.3.5 Präparation von DNA

3.3.5.1 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli*

Einzelne Kolonien von transformierten *E. coli*-Zellen wurden in 4 ml flüssigem LB-Medium oder in 100 ml flüssigem LB-Medium mit Ampicillin als Selektionsmarker über Nacht angezogen (Kap. 3.3.3.1). Die Isolierung des Plasmids erfolgte aus dem Zellpellet der Kulturen mit dem QIAquick Spin Miniprep Kit oder dem QIAfilter Plasmid Maxi Kit nach Angaben des Herstellers.

3.3.5.2 Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA erfolgte mit dem Kettenabbruch-Reaktionsverfahren nach Sanger¹²³; hierbei werden fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide als Terminatoren eingesetzt.

Die Sequenzierung wurde von der Firma SRD bzw. Seqlab durchgeführt. Hierzu wurden 150 - 300 ng DNA mit 5 pmol Sequenzierprimer versetzt und mit MQ-Wasser auf 7 µl aufgefüllt.

3.3.6 Analyse von DNA

3.3.6.1 Restriktion von DNA

Die Spaltung der DNA wurde mit Endonukleasen und den vom Hersteller empfohlenen Puffersystemen zu den empfohlenen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Die Restriktion wurde für eine Stunde bis über Nacht bei 37°C durchgeführt.

Die einzusetzende Enzymmenge für die Restriktion innerhalb von einer Stunde wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\left(m_P \cdot \frac{G_\lambda \cdot S_P}{L_P \cdot S_\lambda}\right)}{20} = V_E$$

(m_P : Masse an zu verdauendem Plasmid; G_λ : Genomgröße des λ -Phagen; S_λ : Schnittstellenanzahl auf λ -Phagengenom; L_P : Länge des Plasmids; S_P : Schnittstellenanzahl auf Plasmid; V_E : einzusetzendes Volumen an Enzym [µl] für Restriktion in 1 h)

Anschließend wurde die DNA zur Aufreinigung einer Phenol-Chloroform-Extraktion (Kap. 3.3.7.5) unterzogen.

3.3.6.2 Ligation von DNA

DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden wurden durch die T4-DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers kovalent miteinander verknüpft. Vektor-DNA wurde mit einem 5-fachen Überschuss an Insert versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit T4-DNA-Ligase inkubiert.

3.3.6.3 PCR (Polymerasekettenreaktion)

Bei der Polymerasekettenreaktion wird mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase ein definierter Nukleinsäurebereich exponentiell vervielfältigt.

Hierzu mussten dem Ansatz freie Desoxynukleotide, eine doppelsträngige Nukleinsäure (Matrize) und hybridisierende Oligonukleotide (Primer) sowie die hitzestabile DNA-Polymerase in vom Hersteller empfohlenen Puffer zugefügt werden. Die Reaktion erfolgte in Zyklen mit hitzeinduzierter Strangtrennung, Hybridisierung und anschließender Synthese. Die Hybridisierungstemperatur richtete sich nach den verwendeten Oligonukleotiden und die Elongationsdauer nach der Länge des zu amplifizierenden Nukleinsäurebereichs.

Tabelle 3-18: PCR-Ansätze

PCR-Ansatz für Klonierung

100 ng Matrize
je 30 pmol Primer
200 µM dNTPs
1x Phusion Puffer
1 µl Phusion
Ad 100 µl MQ

PCR-Programm für Klonierung

	98°C 30 sec
	<hr/>
	98°C 30 sec
25 Zyklen	T _{an} °C 30 sec
	72°C 1 min/ 1 kb
	<hr/>
	72°C 7 min

Nach der PCR wurde die DNA mit dem QIAquick Gel Extraction Kit aus präparativen Agarosegelen nach Anleitung des Herstellers eluiert (Kap. 3.3.2.1.1).

Für die *in vitro* Transkription wurde mit den PCR-Produkten nochmals eine PCR durchgeführt. Hiervon wurden vier Ansätze vereinigt und über Phenol-Chloroform-Extraktion (Kap. 3.3.7.5) aufgereinigt.

3.3.6.3.1 PCR zur Analyse des Spleißmusters

Die PCR wurde zur Analyse der Spleißmuster der Minigene verwendet. Hierzu wurden 4 µl cDNA (Kap. 3.3.9.1) mit 46 µl Mastermix versetzt.

Tabelle 3-19: Ansatz für PCR Mastermix der PCR zur Analyse des Spleißmusters

PCR-Mastermix 1x

	15 pmol pMA_exl-exIII_fwd
	15 pmol pMA_exl-exIII_rev
	200 µM dNTPs
	1x Thermopol Puffer
	1 µl Taq
	Ad 46 µl MQ

PCR-Programm PCR zur Analyse des Spleißmusters

	96°C 1 min
	96°C 30 sec
35 Zyklen	57°C 20 sec
	72°C 45 sec
	72°C 7 min

Der PCR-Ansatz wurde mit 10 µl Ladepuffer versetzt und 8 µl davon auf einem 3%igen Agarosegel analysiert.

3.3.7 Präparation von RNA

3.3.7.1 *In vitro* Transkription

Die Matrize für die *in vitro* Transkription wurde durch Aufreinigung des Plasmids mittels QIAfilter Plasmid Maxi Kit und linearisieren mit dem Restriktionsenzym XbaI oder PCR mit Primern, die einen T7-Promotor einführen, durchgeführt.

Für jeden Ansatz wurden entweder 100 µg linearisiertes Plasmid (Kap. 3.3.6.1) oder vier PCR-Reaktionen (Kap. 3.3.6.3) als Matrize eingesetzt. Vor der *in vitro* Transkription wurden die Matrizen mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (Kap. 3.3.7.5) gereinigt und in 40 µl MQ-Wasser aufgenommen.

Tabelle 3-20: Ansatz für *in vitro* Transkription***In vitro* Transkriptionsansatz**

DNA Matrize (50 - 100 µg)
25 mM MgAc ₂
200 mM Tris-HCl pH 8,0
20 mM DTT
2 mM Spermidin
je 4 mM ATP, CTP, GTP, UTP
1-5 µl T7-Polymerase
Ad 500 µl – 1 ml MQ

Die Transkription erfolgte über Nacht bei 37°C. Anschließend wurden die Ansätze mit Ethanol gefällt (Kap. 3.3.7.4), in 1 ml Ladepuffer aufgenommen und auf präparativen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Durch Bestrahlung des Gels mit UV-Licht (254 nm), konnten die Banden sichtbar gemacht, mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und über Nacht in 300 mM NaAc pH 6,5 bei 4°C aus dem Gel eluiert werden. Danach wurde die RNA nochmals mit Ethanol gefällt und in einem passenden Volumen MQ-Wasser aufgenommen.

3.3.7.2 *In vitro* Transkription mit Kit

Zur *in vitro* Transkription wurden mit Spel linearisierte (Kap. 3.3.6.1) und über Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigte (Kap. 3.3.7.5) Plasmidderivate von pSFV eingesetzt. Hierzu wurde das mMESSAGE mMACHINE SP6 Kit von Ambion nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.3.7.3 RNA-Präparation aus eukaryotischen Zellen

Die RNA-Präparation nach der Lipofektion (Kap.3.3.4.3) erfolgte mittels Trizol. Hierzu wurde das Medium abgenommen und die *wells* mit 500 µl Trizol versetzt. Die Zellen wurden zur Lyse 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach in ein Maxtract Röhrchen (Qiagen) überführt und mit 100 µl Chloroform versetzt. Nach starkem Schütteln wurde der Ansatz für 10 min bei 12000 xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Maxtract Röhrchen überführt, mit 200 µl Chloroform versetzt und erneut für 5 min bei 12000 xg und 4°C zentrifugiert. Um die RNA zu Fällern, wurden 0,75 µl Glycoblue und 250 µl Isopropanol zugegeben. Der Ansatz wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 75%igem Ethanol für 5 min bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit gewaschen und anschließend getrocknet und in 35 µl MQ gelöst.

3.3.7.3.1 DNase Restriktion

Bei der RNA-Präparation mit Trizol wird auch Plasmid DNA mit präpariert und um diese ab zu bauen, wird eine DNase Restriktion durchgeführt. Hierzu wurde die gesamte RNA (35 µl) der Präparation mit 4 µl Turbo DNase Puffer und 1 µl Turbo DNase versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit 60 µl MQ auf 100 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und eine Ethanol-fällung (Kap. 3.3.7.4) durchgeführt. Die RNA wurde nach der Fällung in 20 µl MQ aufgenommen und auf eine Konzentration von 100 ng/ µl eingestellt.

3.3.7.4 Ethanol-fällung

Zum Fällung von RNA wird meist die Ethanol-fällung verwendet. Hierbei wurde die RNA mit 0,1 Vol 3 M NaAc pH 6,5 angesäuert und dann mit 5 Vol reinem Ethanol bei -20°C mind. eine Stunde oder über Nacht gefällt. Danach wurde die RNA 30 min - 1 h bei 8500 rpm abzentrifugiert und das Pellet 15 min mit 1 Vol 70% Ethanol bei 8500 rpm gewaschen und anschließend in MQ-Wasser gelöst.

3.3.7.5 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion dient zur Abtrennung von Proteinen von RNA oder DNA, da die Proteine im Phenol denaturieren und sich dann in der Interphase (zwischen der organischen und der wässrigen Phase) ansammeln, während die Nukleinsäuren sich in der wässrigen Phase lösen.

Hierzu wurde die Nukleinsäure mit 1 Vol Phenol versetzt und in ein MaXtract-Gefäß überführt. Durch Zentrifugation nach Anleitung des Herstellers wurden die beiden Phasen getrennt und die obere wässrige Phase wurde mit 1 Vol Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1) versetzt und nochmals nach Anleitung des Herstellers zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase mit Isopropanol (Kap. 3.3.7.6) gefällt.

3.3.7.6 Isopropanol-fällung

Hierbei wurde die Nukleinsäure mit 0,1 Vol 3 M NaAc pH 6,5 und 1 Vol Isopropanol (4°C) versetzt und mind. 30 min oder über Nacht bei -20°C gefällt. Danach wurde die Nukleinsäure 30 min - 1 h bei 8500 rpm und 4°C abzentrifugiert und das Pellet 15 min mit 1 Vol 70% Ethanol bei 8500 rpm gewaschen und anschließend in MQ-Wasser gelöst.

3.3.8 Markierung von RNA

3.3.8.1 Dephosphorylierung des 5'-Endes

Für die Markierung von RNA mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ musste das Triphosphat am 5'-Ende der *in vitro* transkribierten RNA (Kap. 3.3.7.1) abgespalten werden. Hierzu wurde die alkalische Phosphatase aus Kalbsdarm (AP) verwendet.

Tabelle 3-21: Ansatz zur Dephosphorylierung des 5'-Endes

Dephosphorylierung

50 pmol <i>in vitro</i> transkribierte RNA
1x AP-Puffer
2 µl AP
Ad 20 µl MQ

Die Reaktion wurde für 15 min bei 50°C durchgeführt und danach das Enzym für 3 min bei 95°C hitzeinaktiviert.

3.3.8.2 Radioaktive Markierung von RNA

In dieser Arbeit wurde $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ zur radioaktiven Markierung von RNA am 5'-Ende verwendet. Durch die Polynukleotidkinase (PNK) wurde an die dephosphorylierte RNA (Kap. 3.3.8.1) ein $\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ gebunden.

Tabelle 3-22: Ansatz zur radioaktiven Markierung von RNA

Radioaktive Endmarkierung

10 µl dephosphorylierte RNA
6 µl $\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$
1x PNK-Puffer
1 µl PNK

Die Reaktion wurde für eine Stunde bei 37°C durchgeführt und durch die Zugabe von 20 µl 2x RNA-Ladepuffer (Harnstoff) abgestoppt.

Das Aufreinigen der markierten RNA erfolgte über Gelelektrophorese (Kap. 3.3.2.2). Zur Elution des radioaktiv markierten Fragments aus dem Gel wurde ein Röntgenfilm eine Minute auf das Gel aufgelegt, wobei die Position auf dem Gel durch Leuchtaufkleber markiert wurde. Der Film wurde entwickelt (Entwicklerbad/ Wasserbad/ Fixierbad/ Wasserbad/ Trocknen) und auf das Gel aufgelegt, wobei die Positionierung anhand der Leuchtaufkleber erfolgte, und das markierte Fragment wurde mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Zur Gelelution wurde das Gelstück zwei Mal 30 min oder über Nacht auf Eis bzw. bei 4°C in 300 mM NaAc pH 6,5 inkubiert und mit Ethanol gefällt (Kap.3.3.7.4). Die Radioaktivität der markierten RNA (cpm/ µl) wurde mithilfe des Szintillationszählers bestimmt, wobei 1 µl markierte RNA in 4 ml Szintillationsflüssigkeit vermessen wurde.

3.3.9 Analyse von RNA

3.3.9.1 cDNA Synthese

Zur Analyse der Spleißmuster der Minigene wurde die präparierte RNA (Kap. 3.3.7.3) in DNA umgeschrieben und danach mittels PCR (Kap.3.3.6.3.1) amplifiziert.

Tabelle 3-23: Anlagerungsansatz für cDNA Synthese

Ansatz für cDNA Synthese

4 µl (400ng) RNA
10 pmol rev_pMA ExIII
0,5 µM dNTPs
Ad 13 µl MQ

Der in Tabelle 3-23 beschriebene Ansatz wurde zur Anlagerung der Primer an die RNA 5 min bei 65°C inkubiert und danach auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde jeder Ansatz mit 7 µl eines Mastermixes aus je 2 µl DTT (0,1 M), 4 µl FS-Puffer (5x) und 1 µl Superscript II bzw. MQ als Kontrolle versetzt. Die cDNA Synthese wurde für eine Stunde bei 42°C inkubiert und für 15 min bei 70°C inaktiviert. Anschließend wurden die Proben für die PCR zur Analyse des Spleißmusters (Kap. 3.3.6.3.1) eingesetzt.

3.3.9.2 Real-Time *quantitative* PCR (qRT-PCR)

Zur Analyse der RNA-Mengen der Luziferasekonstrukte wurde eine qRT-PCR genutzt. Dies ist eine Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren. Der fluoreszierende Farbstoffe (SYBR Green) interkaliert in die während der PCR synthetisierte DNA. Dadurch kann die Amplifikation der Nukleinsäuren in Echtzeit verfolgt werden. Bei einer PCR-Reaktion kann zu Beginn von einer annähernd exponentiellen Vermehrung der DNA-Fragmente ausgegangen werden. Durch Anhäufung von Produkten oder Limitierung von Oligonukleotiden und Nukleotiden verlangsamt sich die Reaktion mit der Zeit. Als Messgröße wird die Zyklenzahl (Ct-Wert, *cycle threshold*) verwendet, bei der sich das Fluoreszenzsignal erstmals deutlich vom Hintergrund abhebt, die Reaktion aber noch exponentiell verläuft.

Der Reaktionsansatz (Tabelle 3-24) ohne cDNA wurde in jedes *well* einer 96-*well*-Platte vorgelegt. Dann wurden je 5 µl der cDNA (Kap.3.3.9.1) hinzugefügt. Jede Probe wurde in Doppelbestimmung gemessen und davon der Mittelwert gebildet. In den Proben wurden die Firefly Luziferase-Gene und die *Renilla* Luziferase-Gene als interne Kontrolle detektiert. Aus diesen beiden Werten wurde der Δ Ct-Wert gebildet. Nach der Amplifikation wurde eine Schmelzkurve zur Analyse der Reinheit der Produkte durchgeführt.

Tabelle 3-24: Reaktionsansatz und Programm für qRT-PCR

Reaktionsansatz für 1 qRT-PCR Reaktion

10 µl SYBR Green
10 pmol je Oligonukleotid
Ad 15 µl MQ

PCR-Programm für qRT-PCR

40 Zyklen	95°C 20 sec
	95°C 3 sec
	60°C 30 sec
	95°C 15 sec
	60°C 1 min
	In 0,3°C Schritten auf 95°C heizen
	95°C 15 sec

3.3.9.3 EMSA (electrophoretic mobility shift assay)

Für die Gelverzögerungsexperimente wurden die in Tabelle 3-25 beschriebenen Ansätze verwendet. Es wurden Rec-Konzentrationen von 0 bis 20 μM getestet, wobei mit γ -[^{32}P]-ATP markierte RNA (Kap. 3.3.8.2) verwendet wurde.

Tabelle 3-25: Ansatz für EMSA**EMSA**

1 – 2 fmol γ -[^{32}P]-ATP markierte RNA
1 μl Shiftpuffer Tris
Steigende Mengen an Rec in Tris-HCl-Puffer
Ad 10 μl MQ

Die RNA wurde vor Zugabe des Proteins 5 min bei 55°C und danach auf Eis inkubiert. Vor dem Auftragen auf ein 6%iges natives Polyacrylamidgel oder ein 1%iges Agarosegel für EMSA wurde der Ansatz mit 10 μl RNA-Ladepuffer für EMSA versetzt. An die Gele wurden 3 - 4 W für Polyacrylamidgele bzw. 70 V für Agarosegele angelegt.

Danach wurden die Gele bei 60°C für 10 – 40 min getrocknet und für 1 h bis über Nacht auf den Phosphorimager aufgelegt. Die Phosphorimagerplatten wurden am TyphoonScanner mit ausgelesen.

3.3.9.3.1 K_D Bestimmung

Mit EMSA kann die Dissoziationskonstante (K_D) einer Bindung bestimmt werden. Hierbei handelt es sich um diejenige Konzentration an Protein, die benötigt wird, damit bei der Hälfte der vorhandenen RNAs die Proteinbindungsstellen belegt sind.

Beim EMSA erscheinen im Gel idealer Weise zwei Banden; eine für die freie RNA und eine höher liegende, verzögerte Bande für den Komplex aus Protein und RNA. Diese Banden wurden beide integriert. Die Intensität der Fläche der verzögerten Bande wurde auf die Gesamtintensität beider Banden normiert und der prozentuale Anteil von proteingebundener

RNA gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Zur K_D -Bestimmung wurde der entstandene Graph nach folgender Formel mit OriginPro 8G gefittet:

$$y = \frac{B_{max} \cdot x^n}{K_D + x^n}$$

(hier: y: prozentualer Anteil an verzögerter RNA, x: Konzentration an Protein [nM]; n: Hill-Koeffizient; Bmax: maximaler Anteil an verzögerter RNA; K_D : Dissoziationskonstante)

3.3.9.4 *In vivo Exportstudie*

In den *in vivo* Exportstudien wurde der Export des HIV-Capsid-Proteins p24 durch das Exportsignal der RcRE pck30 und den Einfluss der Mutationen in RcRE pck30 darauf untersucht. Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Messungen wurden von Dr. Nina Fuchs aus dem Arbeitskreis Löwer durchgeführt.

Hierzu wurden 250 ng der pHIVgag deltaU3 RIII_RcRE pck30 Vektors und 100 ng eines für Rec codierenden Vektors pRec¹¹² in HeLa Zellen transfiziert. Die Transfektionen erfolgten in Triplikaten. Die Rec abhängige RNA-Exportaktivität konnte dann über die Menge an translatiertem p24 Protein bestimmt werden. Hierzu wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion mit 200 µl *passive lysis buffer* von Promega lysiert und abzentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Die Quantifizierung der HIV p24 Menge erfolgte mit dem RETROtek HIV-1 p24 Antigene ELISA 2.0 Kit von ZeptoMetrix nach Herstellerangaben. Die Messungen wurden auf die Gesamtproteinmenge normiert und die durch RcRE pck30 exportierte Menge wurde auf 100% gesetzt.

3.3.10 *Präparation von Proteinen*

3.3.10.1 *Präparation von Proteinen aus eukaryotischen Zellen*

Die Präparation von Proteinen aus eukaryotischen Zellen erfolgte mittels Ripa-Puffer (Sigma). Hierzu wurden die infizierten (Kap. 3.3.4.4.3) bzw. transfizierten (Kap. 3.3.4.3) Zellen zwei Mal mit je 1 ml PBS gewaschen und dann mit 60 µl Ripa-Puffer und 5 µl/ml Protease-Inhibitor-Cocktail versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden danach mit einem Zellschaber abgelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 8000 xg zentrifugiert. Der Überstand enthielt nun die präparierten Proteine und wurde in eine neues Reaktionsgefäß überführt.

Die Konzentration der Proteinlösung wurde mittels eines Bradford-Tests (Kap.3.3.11.1) bestimmt und dann durch Zugabe von Ladepuffer auf 6 bzw. 8 µg/ µl eingestellt. Zur Denaturierung der Proteine wurde die Probe 10 min bei 95 °C inkubiert und danach auf einem SDS-Gel zur Analyse mittels Western Blot (Kap. 3.3.11.3) aufgetrennt.

3.3.10.2 Dialyse

Die Dialyse dient zum Pufferwechsel bei Proteinen. Hierbei wird eine Membran verwendet, welche es den Ionen erlaubt hindurch zu diffundieren. Die Poren der Membran sind jedoch zu klein, um eine Diffusion von Proteinen zu ermöglichen. Dadurch wird langsam der Puffer, in dem das Protein vorliegt, gegen den Puffer, welcher außerhalb der Membran zugegeben wird, ausgetauscht.

Rec wurde von einem unbekannten Puffer in 10 mM Tris-HCl pH 7,5 umgepuffert. Die Dialyse wurde im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. 1 ml Rec wurde in eine Dialysemembran gegeben und für eine Stunde in 500 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,5 Puffer inkubiert. Der Puffer wurde einmal für 3 h gegen frischen Puffer ausgetauscht und danach wurde die Dialysemembran über Nacht in frischem Puffer inkubiert

3.3.11 Analyse von Proteinen

3.3.11.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit Hilfe des Bradford-Tests. Durch die Bindung von Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm zu 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm als Maß korreliert damit direkt mit der Proteinkonzentration der Lösung.

Um die gemessenen Absorptionswerte einer Proteinkonzentration zuordnen zu können, wurde eine Eichgerade mit bekannter Proteinkonzentration von BSA erstellt. Die Eichgerade wurde mit 0, 2,5, 5, 7,5, 10, 15 und 20 µg BSA gemessen, die angegebenen Mengen wurden in 800 µl MQ verdünnt und je 200 µl des Bradford-Reagenz zugegeben. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm gemessen.

Die Proteinextrakte (Kap.3.3.10) wurden für die Konzentrationsmessung 1:50 mit MQ verdünnt. Von der Verdünnung wurden 200 µl mit 600 µl MQ und 200 µl Bradford-Reagenz versetzt und die Absorption bei 595 nm bestimmt. Anhand der Geradengleichung konnte dann die Konzentration des Proteinextrakts bestimmt werden. Die Messung wurde in Triplikaten durchgeführt.

3.3.11.2 Luziferase Messung

Für die Analyse der Spleißregulation im Reportergenkontext wurde die Firefly Luziferase verwendet. Die *Renilla* Luziferase wurde zur Transfektionskontrolle eingesetzt. Hierbei wird Licht detektiert, welches bei der Oxidation von Luziferin entsteht. Diese Reaktion kann von Luziferase unter Anwesenheit von ATP katalysiert werden. Für die Detektion der Luziferase wurde das Dual-Glo Luziferase Assay System von Promega nach Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden mindestens zwei Mal Triplikate vermessen.

3.3.11.3 Western Blot

Für den spezifischen Nachweis der viralen GFP Expression wurden Western Blots durchgeführt. Alle Messungen wurden einmal reproduziert. Hierbei werden die Proteine eines SDS-Gels (Kap.3.3.2.3) beim Blotten elektrophoretisch auf eine Membran übertragen. Die hier verwendete hydrophobe PVDF-Membran musste zunächst für 3 bis 5 min in Methanol aktiviert werden. Anschließend wurden Membran und Gel in Transferpuffer für 5 min äquilibriert. Der Aufbau (von unten nach oben) beinhaltete: 1 Schwamm der Blotting Apparatur in Transferpuffer getränkt, 2 Whatman-Papiere in Transferpuffer getränkt; PVDF-Membran in Methanol aktiviert und in Transferpuffer äquilibriert, SDS-Gel in Transferpuffer äquilibriert, 2 Whatman-Papiere in Transferpuffer getränkt, 1 Schwamm der Blotting Apparatur in Transferpuffer getränkt. Dieser Aufbau wurde in die Mini V8.10 Blotting-Apparatur gelegt, diese mit 1 l Transferpuffer gefüllt und für 1,5 h bei 50 V und 4°C geblottet. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C in Blockierlösung blockiert. Danach wurde die Membran für 1h bei Raumtemperatur mit dem erst Antikörper inkubiert. Der Anti-GFP Antikörper wurde 1:1000, der Anti- β -Aktin Antikörper 1:10000 in Blockierlösung verdünnt. Die Membran wurde anschließend bei Raumtemperatur 1 h in 1x TBST gewaschen, wobei der Puffer alle 15 min gewechselt wurde. Die Inkubation des zweiten Antikörpers erfolgte ebenfalls in Blockierlösung für 1h bei Raumtemperatur. Hierbei wurden die Antikörper 1:8000 verdünnt. Danach wurde die Membran nochmals wie oben beschrieben gewaschen. Der Nachweis erfolgte durch Chemolumineszenz, da die Meerrettich Peroxidase (HRP) des zweiten Antikörpers das Luminol im ECL Kit oxidiert und hierbei Licht entsteht. Die Membranen wurden am LumiImager ausgelesen.

3.3.11.4 Fluoreszenzmessung von GFP

Zur Analyse der RNA-Schalter wurde die GFP Fluoreszenz in den infizierten (Kap 3.3.4.4.3) Zellen analysiert. Die Zellen wurden zur Infektionskontrolle mit unregulierten mCherry exprimierenden VRP koinfiziert.

Alle Messungen wurden einmal reproduziert. Zur Analyse wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und danach mit 100 μ l Trypsin-EDTA abgelöst und mit 200 μ l Medium versetzt. Die Zellen wurden für 10 min bei 1000 xg geerntet und in 1 ml PBS aufgenommen. Die GFP Fluoreszenz wurde bei 488 nm angeregt und ein Fluoreszenzspektrum von 500 bis 550 nm aufgenommen. Die mCherry Fluoreszenz wurde im Anschluss bei 587 nm angeregt und ein Fluoreszenzspektrum von 600 bis 650 nm aufgenommen. Das maximale Fluoreszenzsignal bei 510 nm für GFP und 610 nm für mCherry wurde für die Auswertung verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Biochemische Analyse der RcRE von HERV-K

4.1.1 Analyse des minimalen Rec Bindungsmotivs auf RcRE pck30

Die 2D-Struktur der Exportsequenz RcRE pck30 konnte über chemische Interferenzstudien (SHAPE -selective 2' hydroxyl acylation analysed by primer extension und *in-line probing*) aufgeklärt werden (siehe Abbildung 2-26 A).¹¹³ Durch SHAPE-Analysen von an Rec gebundener RNA wurden Rec Bindungsstellen auf RcRE pck30 vorhergesagt. Diese liegen hauptsächlich im zentralen Bereich der Struktur, in den terminalen Schleifen L3, L5, L9 und den Knotenpunkten J3-4, J4-9, J5-6 und J7-8 (siehe Abbildung 2-26 B). Es fällt auf, dass diese Bindungsstellen oft purinreich sind und GGAA- oder AAGG-Motive enthalten (M1 – M5 in Abbildung 2-26).

Zur Überprüfung, ob es sich bei diesen Sequenzmotiven um die Bindemotive handelt, wurden RNAs entworfen, die Haarnadelstrukturen ausbilden, welche die purinreichen Motive in der terminalen Schleife präsentieren. In RcRE pck30 wurden sowohl GGAA- als auch AAGG-Motive gefunden (Abbildung 2-26 B). Es wurden deshalb für beide Motive Haarnadelstrukturen entworfen. Zur Klärung, ob auch GGA-Motive oder purinreiche Schleifen allein zur Bindung ausreichen, wurden auch solchen Konstrukte analysiert. Da auch GGAA-Motive im Doppelstrang in dem RcRE pck30 beobachtet wurden, wurde eine Haarnadelstruktur mitgeführt, welche eine GGAA-Sequenz im Stamm trägt. Als Negativkontrolle diente eine Haarnadel, welche über eine pyrimidinreiche Schleife verfügt. Die Strukturen der entworfenen Konstrukte sind in Abbildung 4-1 gezeigt.

Ergebnisse

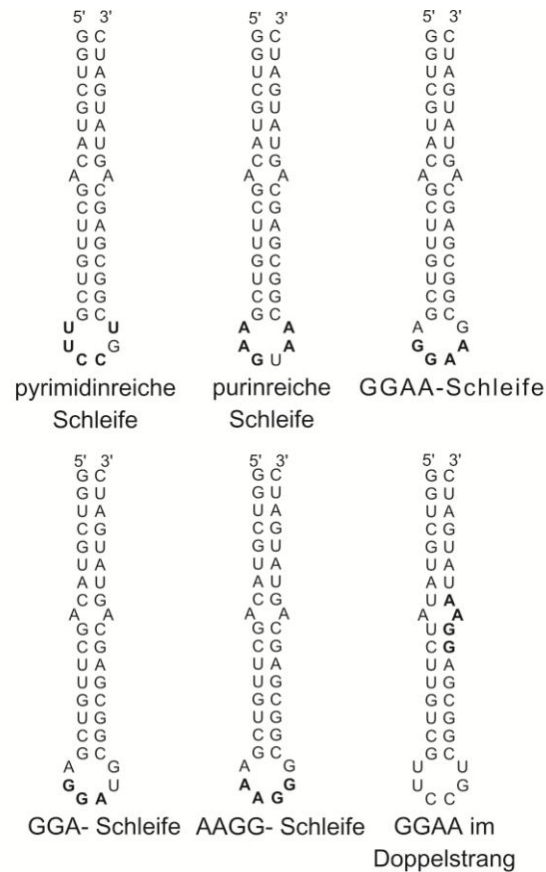


Abbildung 4-1: Darstellung der Stammschleifen mit den GGAA-Motiven in der Schleifenregion sowie einer pyrimidinreichen Sequenz als Kontrolle. Die jeweiligen potentiellen Bindemotive sind fett dargestellt.

Für eine biochemische Analyse der RNA-Bindung an Rec mussten die Haarnadel-bildenden RNA-Element *in vitro* transkribiert werden. Hierzu wurden sie in den Vektor pSP64 kloniert.

4.1.1.1 Klonierung der minimalen Bindungsmotive

Als Ausgangsvektor diente der in Abbildung 4-2 dargestellte Vektor pSP64 RcRE pck30.

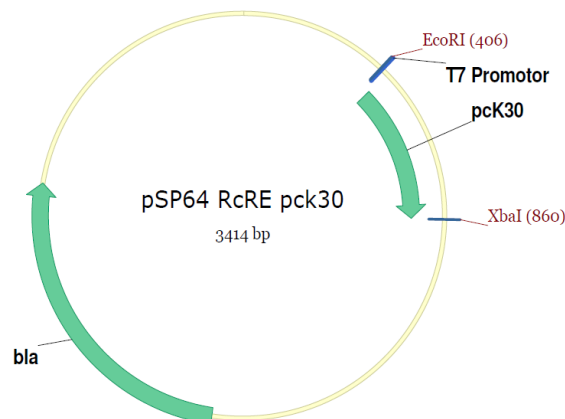


Abbildung 4-2: Vektorkarte des Vektors pSP64 RcRE pck30. Der Vektor beinhaltet die komplette RcRE pck30 von HERV-K unter der Kontrolle eines T7-Promotors und eine Ampicillinresistenz (bla = β -Lactamase). Dieser Vektor diente als Ausgangsvektor für die Klonierungen der haarnadelbildenden Sequenzen. Gene sind als Pfeile dargestellt.

Der Vektor trägt einen T7 Promotor für die *in vitro* Transkription und codiert für die β -Lactamase, welche die Ampicillinresistenz vermittelt. Direkt hinter der zu transkribierenden Sequenz liegt eine XbaI-Schnittstelle, welche zur Linearisierung des Vektors vor der *run-off* Transkription genutzt werden kann.

Für den Austausch des RcRE pck30 gegen die für die Haarnadel codierenden Sequenzen wurden ca. 20 nt lange, überlappende Oligonukleotide bestellt. Für das Ds_GGAA Konstrukt wurden die Oligonukleotide Ds_GGAA(5-3) und Ds_GGAA(3-5) verwendet, wobei das Oligonukleotid Ds_GGAA(5-3) eine EcoRI und das Ds_GGAA(3-5) Oligonukleotid eine XbaI-Schnittstelle und den T7-Promotor einführen. Für die weiteren Konstrukte wurden analoge Oligonukleotide eingesetzt und in einer PCR-Reaktion ohne Matrize zu einem durchgehenden Doppelstrang vervollständigt. Die PCR-Produkte und der Vektor pSP64_RcRE pck30 wurden mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XbaI geschnitten und ligiert. *E. coli* DH5 α wurde mit dem Ligationsansatz transformiert. Die Insertion der Sequenzen in der gewünschten Orientierung sowie der Ausschluss von Sekundärmutationen wurde mittels Sequenzierung mit dem Oligonukleotid pSP64_seq_fwd bestätigt. Für die erhaltenen Vektoren ist stellvertretend in Abbildung 4-3 der Vektor mit der GGAA-Schleife (pSP64_Hp-GGAA) dargestellt.

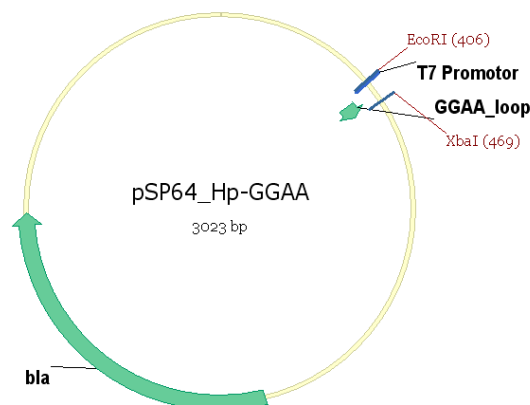


Abbildung 4-3: Vektorkarte für Haarnadel bildende Sequenzen in pSP64.

Hier gezeigt ist stellvertretend der Vektor pSP64_Hp-GGAA, welcher hinter dem T7-Promotor eine Haarnadelstruktur ausbildende Sequenz und eine Ampicillinresistenz (*bla* = β -Lactamase) enthält. Gene und funktionelle Bereiche sind als Pfeile dargestellt.

4.1.1.2 Bindung von Rec an Haarnadelstrukturen mit purinreichen Schleifen

Die Haarnadelstrukturen wurden mit einer run-off Transkription *in vitro* transkribiert. Die RNA wurde anschließend mit γ -[32 P]-ATP radioaktiv markiert und mit steigenden Konzentrationen an Rec inkubiert. Zur Vermeidung von unspezifischen Wechselwirkungen wurde den Ansätzen Hefe-t-RNA zugefügt. Die entstandenen Komplexe wurden anschließend in einem Gelverzögerungsexperiment gelelektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch analysiert. Die Gelbilder sind in Abbildung 4-4 gezeigt.

Die Dissoziationskonstante der Haarnadelstruktur, welche das GGAA-Motive in der Schleife enthält, wurde durch einen Fit an die Hillfunktion bestimmt (Kap. 3.3.9.3.1). Hierzu wurde

Ergebnisse

durch Integration der Banden der Anteil an verzögerter RNA ermittelt. Der Fit ist in Abbildung 4-5 für das Konstrukt mit dem GGAA-Motiv gezeigt. Da der Übergang von ungebundener zu gebundener RNA nicht detailliert aufgelöst werden konnte, handelt es sich bei der bestimmten Dissoziationskonstante um eine Abschätzung. Für die anderen Konstrukte war kein Fit berechenbar, da hier innerhalb der betrachteten Rec Konzentration keine komplette Verzögerung erreicht wurde.

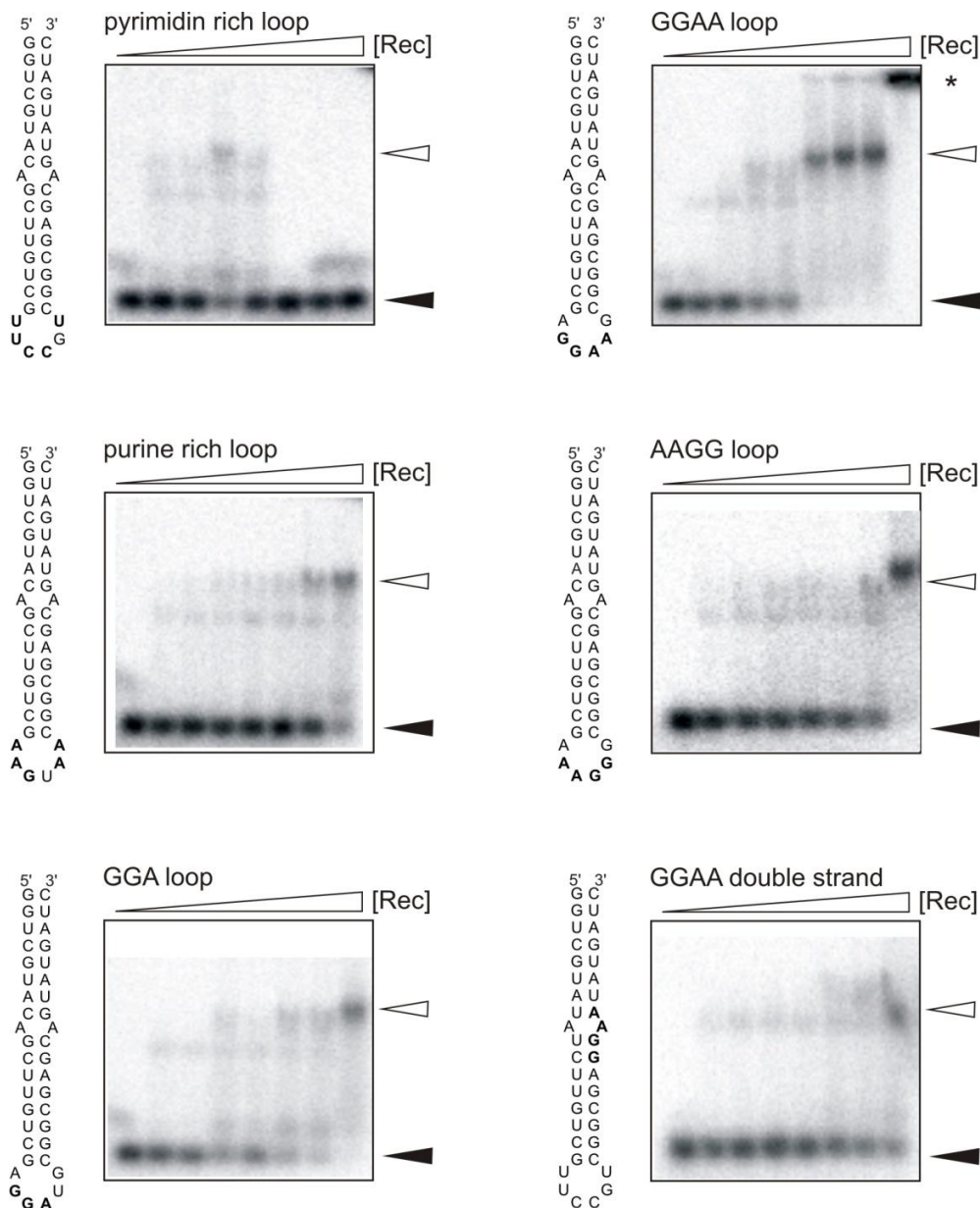


Abbildung 4-4: 3%ige Agarosegele für Gelverzögerungsexperimente der 40 nt langen Haarnadelstrukturen. 10 fmol radioaktiv markierter RNA wurden mit steigenden Konzentrationen von Rec (0, 0,8, 1,2, 1,6, 2,0, 2,4, 2,8 und 3,2 μ M) inkubiert. Um unspezifische Wechselwirkungen mit RNA zu vermeiden wurden jedem Ansatz 25 μ g/ ml Hefe-t-RNA zugesetzt. Die schwarzen Pfeilköpfe zeigen ungebundene RNA und die weißen verzögerte RNA-Rec-Komplexe an. Die sehr großen Komplexe der Haarnadelstruktur mit der GGAA-Schleife bei hoher Rec-Konzentration lief nicht ins Gel ein (mit Stern markiert). Alle Experimente wurden mindestens einmal reproduziert. Entnommen aus Langner *et al.*¹¹³.

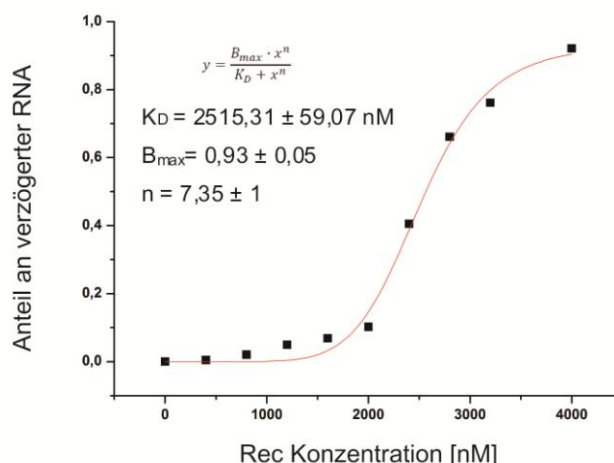


Abbildung 4-5: Fit nach Hillfunktion für Gelverzögerungsexperiment von Haarnadelstruktur mit GGAA-Motiv in der Schleife.

Aufgetragen wurden die gemittelten Anteile an verzögerter RNA gegen die Rec Konzentration in nM. Der Fit ergab einen K_D von $2,5 \pm 0,06 \mu\text{M}$, bei einem B_{max} von $0,93 \pm 0,05$ und einem Hillkoeffizient n von 7 ± 1 .

Aus Abbildung 4-4 ist ersichtlich, dass die Haarnadelstruktur mit der pyrimidinreichen Schleifensequenz nicht verzögert wurde und somit nicht an Rec zu binden scheint. Sehr stark verzögert wurde dagegen die Haarnadelstruktur mit dem GGAA-Motiv in der Schleife. Es konnte eine Dissoziationskonstante von ca. $2,52 \pm 0,06 \mu\text{M}$ abgeschätzt werden, wobei der Fit mit einem Hill-Koeffizient von 7 ± 1 deutlich auf eine kooperative Bindung hindeutet. Es entstand bei hoher Rec-Konzentration ein so großer Komplex, dass dieser in der Geltasche verblieb und nicht ins Gel einlief (in Abbildung 4-4 mit Stern markiert).

Die Bindung von Rec an die Konstrukte mit den GGA- und AAGG-Motiven und der purinreichen Schleife verzögerten bei wesentlich höheren Rec-Konzentrationen als die Haarnadelstruktur mit dem GGAA-Motiv in der Schleife. Bei diesen Konstrukten ist in Abbildung 4-4 erst bei der höchsten getesteten Rec Konzentration von $3,2 \mu\text{M}$ eine verzögerte Bande sichtbar. Für das Konstrukt mit dem GGAA-Motiv im Bereich des Stamms konnte nur eine sehr schwache Verzögerung beobachtet werden.

4.1.2 Einfluss von Mutationen der purinreichen Motive auf die Bindung von Rec an das RcRE pck30

Die Gelverzögerungsexperimente der Haarnadelstrukturen deutete stark auf eine Bindung von Rec an GGAA-Motive hin (Abbildung 4-4). Um dies zu bestätigen, sollten in RcRE pck30 GGAA-, aber auch AAGG-Motive mutiert und anschließend das Bindeverhalten des mutierten RcRE pck30 an Rec untersucht werden. Hierzu wurden diejenigen Motive mutiert, die bereits über chemische Interferenzstudien als potentielle Bindungsmotive in RcRE pck30 bestimmt wurden.¹¹³ Das AAGG-Motiv M1 in Schleife L3 wurde zu AUCG mutiert, das GGAA-Motiv M2 in Schleife L5 zu GUUC, das AAGG-Motiv M3 im Knotenpunkt J5-6 zu ACCG, das AAGG-Motiv M4 in der internen Schleife von P6 zu ACCG und das GGAA-Motiv

M5 im Knotenpunkt J4-9 zu GCUA. Die Motive sind in Abbildung 2-26 B eingezeichnet. Zusätzlich wurden Doppelmутanten mit Mutationen in M2 und M5 bzw. M3 und M5 und eine Dreifachmutante mit Mutationen in M3, M4 und M5 untersucht. Die Kombination der Mutation M2 & M5 entfernt die beiden potentiell von Rec gebundenen GGAA-Motive, während die Mutation M3, M4 & M5 alle potentiellen Rec-Bindemotive aus dem zentralen Bereich der Struktur entfernt. Hierbei stellt die Mutation M3 & M5 ein Vorläuferkonstrukt dar. Für die Analyse der RNA-Bindung an Rec mussten die RcRE pck30 Mutanten *in vitro* transkribiert werden. Hierzu wurden sie in den Vektor pSP64 kloniert.

4.1.2.1 Klonierung von Mutationen von RcRE pck30

Die Mutationen wurden in den Vektor pSP64_RcRE pck30 (Abbildung 4-2) eingeführt, da in diesem bereits das Wildtyp RcRE pck30 unter der Kontrolle eines T7-Promotors vorhanden war.

Die Mutationen in den GGAA-Motiven (Abbildung 4-2) wurden über das *Phusion site directed mutagenesis Kit* von NEB eingeführt. Hierzu wurde mit den in Tabelle 3-6 aufgeführten Oligonukleotiden Fwd_M1 bis Fwd_M5 und Rev_M1 bis Rev_M5 eine Mutagenese-PCR durchgeführt. Diese amplifizierte den gesamten Vektor. *E. coli* DH5α wurde anschließend direkt mit dem ligierten PCR-Produkt transformiert. Die Mutationen wurde mittels Sequenzierung mit dem Oligonukleotid pSP64_seq_fwd bestätigt. Da die Vektoren nur zur *in vitro* Transkription eingesetzt wurden, wurde nur der T7-Promotor und der zu transkribierende Bereich durch Sequenzierung überprüft und von einer Umklonierung in ein nicht mutiertes Vektorrückgrat abgesehen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Vektoren noch weitere Mutation enthalten, die jedoch für die Transkription irrelevant sind.

Für die erhaltenen Vektoren ist stellvertretend in Abbildung 4-6 der Vektor mit der Mutation M1 dargestellt.

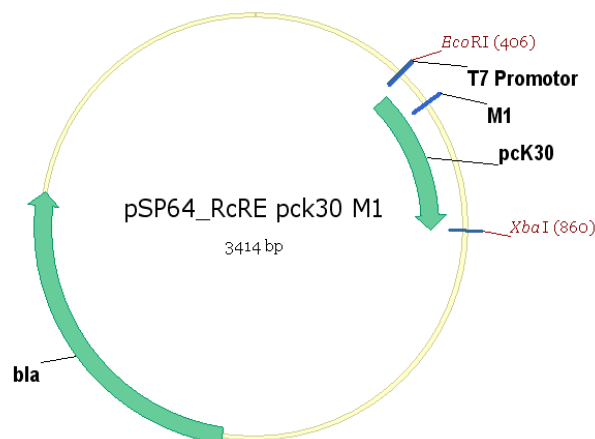


Abbildung 4-6: Vektorkarte für pSP64_RcRE pck30 M1.

Hier gezeigt ist stellvertretend der Vektor pSP64_RcRE pck30 M1, welcher hinter dem T7-Promotor die Sequenz des RcRE pck30 mit der Mutation M1 enthält und eine Ampicillinresistenz (bla = β-Lactamase) trägt. Gene und funktionelle Bereiche sind als Pfeile dargestellt.

4.1.2.2 Analyse der Bindung von Rec an das RcRE pck30 mittels Gelverzögerung

Die RcRE pck30 Mutanten wurden wie bereits für die Haarnadelstrukturen beschrieben (Kap 4.1.1.2) *in vitro* transkribiert, radioaktiv markiert und mit einem Gelverzögerungsexperiment analysiert. Die Gelbilder sind in Abbildung 4-7 gezeigt, während die abgeschätzten Dissoziationskonstanten aller Gelverzögerungsexperimente in Tabelle 4-1 aufgeführt sind.

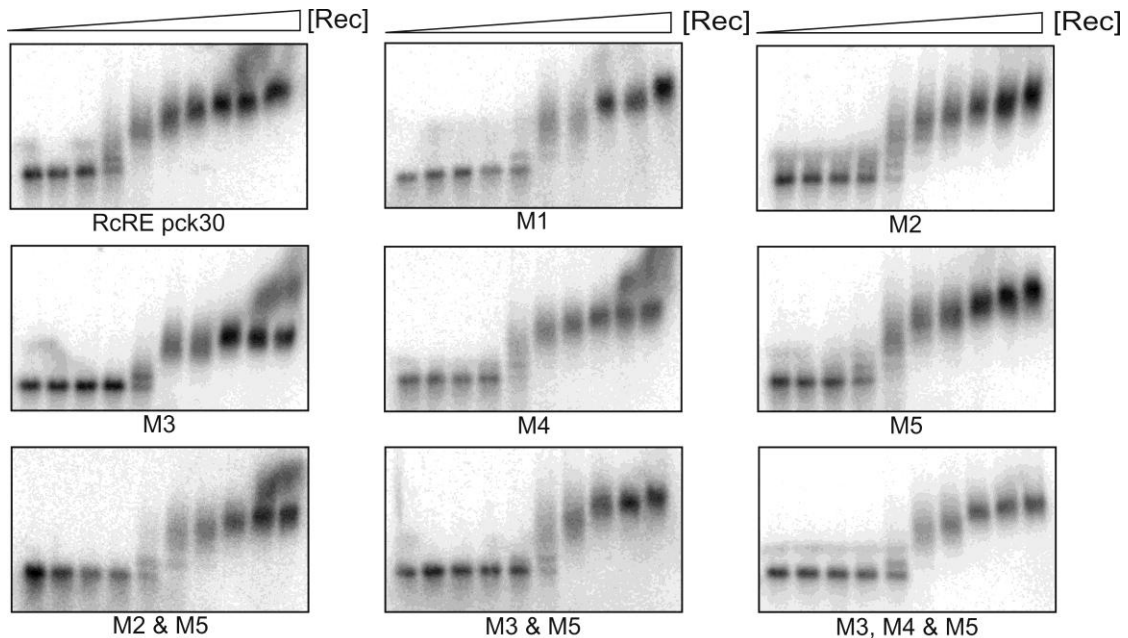


Abbildung 4-7: 1%iges Agarosegel für Gelverzögerungsexperiment von RcRE pck30 und dessen Mutationen.

10 fmol radioaktiv markierter RNA wurden mit steigenden Rec Konzentrationen (0, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,12, 0,16, 0,32, 0,56, 2 µM) inkubiert. Um unspezifische Wechselwirkungen mit RNA zu vermeiden wurden jedem Ansatz 25 µg/ ml Hefe-t-RNA zugesetzt. Die Lage der Mutationen ist in Abbildung 2-26 eingezeichnet. M1: AAGG wurde zu AUCG mutiert; M2: GGAA wurde zu GUUC mutiert; M3: AAGG wurde zu ACCG mutiert; M4: AAGG wurde zu ACCG mutiert; M5: GGAA wurde zu GCUA mutiert. Alle Experimente wurden mindestens einmal reproduziert. Die aus den Gelverzögerungen abgeschätzten Dissoziationskonstanten sind in Tabelle 4-1 aufgelistet. Entnommen aus Langner *et al.*¹¹³.

Tabelle 4-1: Geschätzte Dissoziationskonstanten (K_D) für RcRE pck30 und RcRE pck30 Mutanten.

Konstrukt	K_D [nM]
RcRE pck30	45 ± 2
M1	88 ± 2
M2	80 ± 1
M3	98 ± 2
M4	92 ± 2
M5	149 ± 1
M2 & M5	90 ± 5
M3 & M5	117 ± 1
M3, M4 & M5	100 ± 1

Die K_D -Werte sind in nM angegeben. Es wurden die Mittelwerten von mindestens zwei Gelverzögerungsexperimenten berechnet und daraus über einen Fit an die Hillfunktion (Kap. 3.3.9.3.1) der K_D abgeschätzt. Die zugehörigen Gelverzögerungsexperimente sind in Abbildung 4-7 gezeigt. Nach Langner *et al.*¹¹³.

Aus Abbildung 4-7 ist ersichtlich, dass die RNA in mehreren Stufen verzögert wurde und der Übergang von ungebundener zu gebundener RNA nicht detailliert aufgelöst werden konnte. Dies führte dazu, dass die Dissoziationskonstanten nur abgeschätzt werden konnten (Tabelle 4-1). Dieses Verzögerungsmuster konnte auch bei Wildtyp RcRE pck30 beobachtet werden und wurde auf die Bindung von mehreren Rec-Proteinen an eine RNA zurück geführt.¹¹³ Alle RcRE-Varianten zeigten im Fit an die Hillfunktion (Kap. 3.3.9.3.1) eine starke Kooperativität, was auf eine kooperative Bindung mehrerer Rec-Proteine an das RcRE pck30 hindeutet.

Im Gegensatz zu den Haarnadelstrukturen (Abbildung 4-4) wurde das komplette RcRE pck30 von Rec mit einer um eine Größenordnung geringeren Dissoziationskonstante gebunden. Die Dissoziationskonstanten der Haarnadelstrukturen lagen bei ca. 2,5 μ M, während die von RcRE pck30 bei ca. 45 nM lag.

Wurden die K_D -Werte von Wildtyp RcRE pck30 (ca. 45 nM) mit denen der Mutanten verglichen, lagen die K_D -Werte der Mutanten alle im Bereich von ca. 90 nM und damit ungefähr doppelt so hoch wie die des Wildtyps. Den höchsten K_D wies die Mutation des Motivs M5 mit ca. 150 nM auf. Des Weiteren zeigte auch die Mutation des Motivs M3 mit einem K_D von ca. 98 nM eine starke Erhöhung der Dissoziationskonstante. Das weist darauf hin, dass die Motive M3 und M5 für die Bindung von Rec wichtig sind. Die Konstrukte mit mehrfachen Mutationen zeigten im Schnitt eine höhere Dissoziationskonstante als die

Einfachmutanten, wobei sich der K_D -Wert der Dreifachmutante nicht von denen der Doppelmutanten unterschied.

4.1.2.3 Weitere Analyse der Bindung von Rec an das RcRE pck30 mittels eines Exportassays

Rec exportiert die ungespleißte virale RNA von HERV-K aus dem Nukleus ins Zytosol (Abbildung 2-24). Zur Überprüfung, ob die Mutationen aufgrund ihrer schlechteren Bindung einen Einfluss auf die Exporteffizienz haben, wurden Exportstudien durchgeführt. Hierfür wurde der Vektor pHIVgag deltaU3 RIII verwendet. Dieser Vektor codiert für das HIV-Protein p24. An die mRNA von p24 wurde das RcRE pck30 Element als Exportsignal fusioniert. Demnach kann über die Detektion des p24 Proteins im Zytosol die Exporteffizienz von RcRE pck30 bzw. der Mutanten untersucht werden.

4.1.2.3.1 Klonierung der mutierten RcREs in pHIVgag delta U3 RIII

Für die Exportstudien mussten die in Kap. 4.1.2.2 untersuchten Mutationen des RcRE pck30 in den Vektor pHIVgag delta U3 RIII (Abbildung 4-8) kloniert werden. Der Ausgangsvektor enthält die Sequenz für das gag-Gen von HIV, welches für p24 codiert, mit der LTR23 als Exportsequenz und den flankierenden HIV-LTRs sowie eine Ampicillinresistenz.

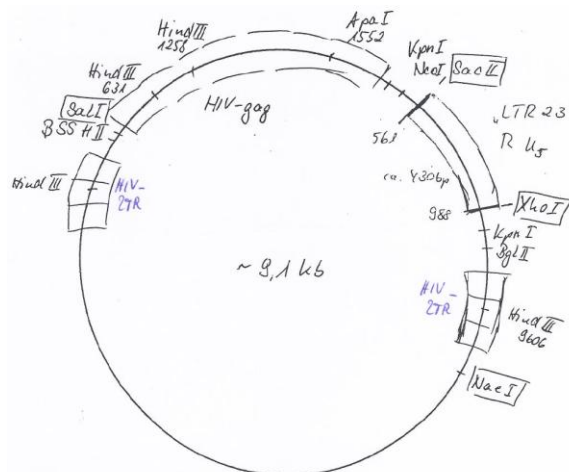


Abbildung 4-8: Vektorkarte für pHIVgag delta U3 RIII.
Der Vektor codiert für das HIV gag-Gen mit den flankierenden LTRs. Außerdem ist eine Ampicillinresistenz enthalten. Gene sind als Kästchen dargestellt.

Der LTR23 (Abbildung 4-8) wurde durch das RcRE pck30 und die entsprechenden Mutanten ersetzt. Hierzu wurden die Sequenzen der RcREs mit den Oligonukleotiden Fwd_RcRE pck30 + SacII und Rev_RcRE pck30 + XhoI über PCR aus dem Vektor pSP64_RcRE pck30 (Abbildung 4-6) amplifiziert. Das Oligonukleotid Fwd_RcRE pck30 + SacII führte eine SacII-Restriktionsstelle ein und das Oligonukleotid Rev_RcRE pck30 + XhoI eine XhoI-Schnittstelle. Die PCR-Produkte und der Vektor pHIVgag delta U3 RII wurden mit SacII und XhoI restringiert, ligiert und *E. coli* DH5α damit transformiert. Die Insertion der Sequenz von RcRE pck30 und deren Mutationen in der gewünschten Orientierung sowie der Ausschluss

Ergebnisse

von Mutationen wurde mittels Sequenzierung mit dem Oligonukleotid Fwd_RcRE pck30 + SacII bzw. Rev_RcRE pck30 + XhoI bestätigt. Für die erhaltenen Vektoren ist stellvertretend in Abbildung 4-9 der Vektor mit dem Wildtyp RcRE pck30 (pHIVgag delta U3 RIII RcRE pck30) dargestellt.

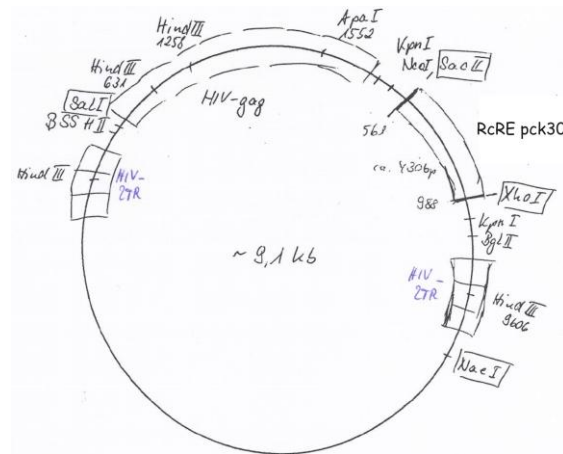


Abbildung 4-9: Vektorkarte für pHIVgag delta U3 RIII RcRE pck30.
Der Vektor codiert für das HIV gag-Gen mit den flankierenden LTRs und das RcRE pck30 als Exportsequenz. Außerdem ist eine Ampicillinresistenz enthalten. Gene sind als Kästchen dargestellt.

4.1.2.3.2 Exportassay der RcRE pck30 Varianten

Für die Exportstudien wurden HeLa-Zellen mit dem pHIVgag Plasmid (Abbildung 4-9) und einem Rec exprimierenden Plasmid transfiziert und nach 24 h wurde über ELISA die Menge an exportiertem p24 bestimmt. Die Versuche wurden von Dr. Nina Fuchs am Paul-Ehrlich-Institut in Langen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-10 gezeigt.

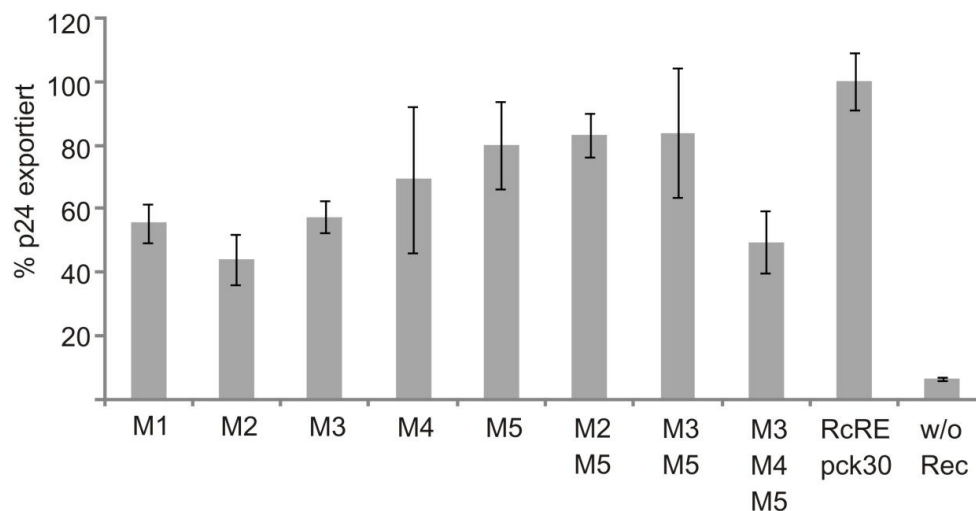


Abbildung 4-10: In vivo Exportstudien von RcRE pck30 mit und ohne Mutationen.
Es wurde das exportierte Protein p24 detektiert, wessen mRNA über das RcRE pck30 bzw. die Mutanten durch das überexprimierte Rec exportiert wurde. Die Menge an exportiertem p24 durch das Wildtyp RcRE pck30 wurde auf 100% gesetzt. Bei der w/o Kontrolle wurde der HIV-Vektor nicht transfiziert und somit handelt es sich hierbei um den Hintergrund der Messungen. Hier ist eine exemplarische Messung von Triplikaten gezeigt. Das Experiment wurde in zwei weiteren unabhängigen Versuchen wiederholt. Nach Langner et al.¹¹³.

In den Exportstudien konnte gezeigt werden, dass alle Mutanten schlechter exportiert wurden als der Wildtyp. Die Mutation des Motives M2 zeigte hier den stärksten Effekt mit

einer Reduktion des Exports auf 45%. Des Weiteren zeigten die Mutationen der Motive M1 und M3 eine Reduktion des Exports auf unter 60%. Die anderen Einzelmutationen wurden mit einer Effizienz von ca. 80% exportiert. Demnach scheinen die Motive M1, M2 und M3 für den Export des RcRE pck30 durch Rec wichtig zu sein. Die Dreifachmutante zeigte ebenfalls eine starke Repression des Exports auf 50%. Hier scheint es sich um einen additiven Effekt der Einzelmutationen zu handeln, was jedoch für die Doppelmutanten nicht beobachtet werden konnte.

Insgesamt unterstützen die Daten der Exportstudien die Gelverzögerungsexperimenten.

4.2 Regulation der viralen Replikation durch RNA-Schalter

In einem weiteren Projekt sollte ein RNA-Schalter entwickelt werden, mit welchem die virale Replikation reguliert werden kann. Als Modellsystem diente SFV. In einem Ansatz wurde das Tetrazyklin bindende Aptamer in den subgenomischen Promotor des SFV inseriert, um die Expression der subgenomischen Gene zu verhindern. In einem weiteren Ansatz wurde das Theophyllin abhängige *hammerhead* Ribozym in den 3'-UTR inseriert. Durch Theophyllin wird die Selbstspaltung des Ribozyms initiiert und dadurch das virale Genom geschnitten, was zu dessen Degradation führt.

4.2.1 Regulation der viralen Replikation durch das Tetrazyklin bindende Aptamer im Bereich des subgenomischen Promotors

In dieser Arbeit wurde mit einem Replikon von SFV gearbeitet, welches nicht mehr für die Strukturproteine (SP) codiert, stattdessen aber das Reportergen *GFP* enthält (für mehr Informationen zum Replikon siehe Kap. 2.3.1.1.3). Der subgenomische Promotor wird von SFV für Synthese der subgenomischen mRNA genutzt, welche für die Strukturproteine codiert. Die Idee war, ein Aptamer zu inserieren, welches entweder den Zugang der Polymerase zum subgenomischen Promotor oder den der Ribosomen zum Startcodon kontrolliert. Nur im ligandfreien Zustand ist eine Erkennung möglich, nach Stabilisation der Struktur bei Ligandbindung nicht mehr. Hierzu wurden die in Abbildung 4-11 schematisch dargestellten Konstrukte entworfen.

Ergebnisse

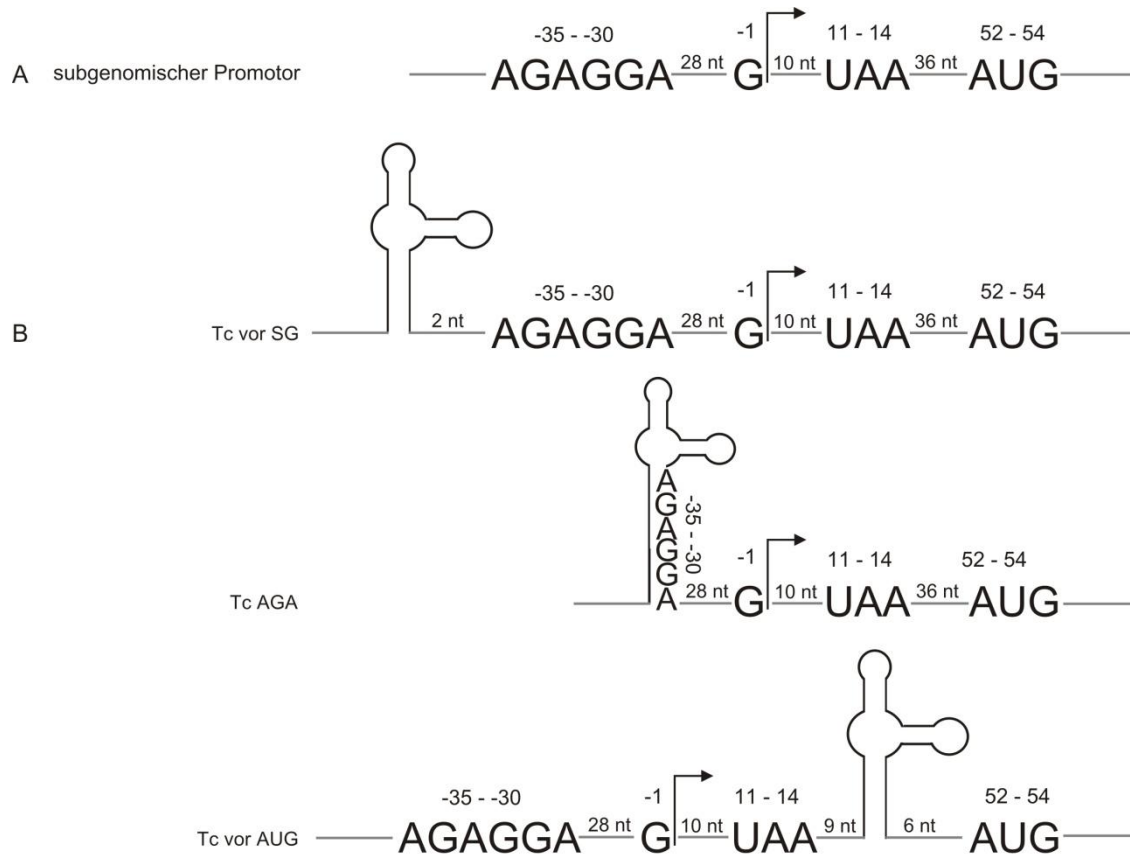


Abbildung 4-11: Schematische Darstellung des subgenomischen Promotors (SG) und der Konstrukte, die das Tetrazyklin bindende Aptamer enthalten. Der Transkriptionsstart ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Zahlen oberhalb der Nukleotide geben die Position in Bezug auf den Transkriptionsstart an.

A: Die regulatorischen Elemente des subgenomischen Promotor sind eine AG-reiche Region 35 nt vor dem Transkriptionsstart und eine UAA-Sequenz 11 nt nach dem Transkriptionsstart. Das Startcodon AUG ist ebenfalls gekennzeichnet (52 – 54). **B:** Für das „Tc vor SG“-Konstrukt wurde das Tetrazyklin bindende Aptamer 2 nt vor die AG-reiche Region gesetzt. Bei dem „Tc AGA“-Konstrukt wurde die gesamte AG-reiche Region in den P1-Stamm des Aptamers integriert und für das „Tc vor AUG“-Konstrukt wurde das Aptamer 6 nt vor dem Startcodon eingebracht.

Der subgenomische Promotor ist noch nicht komplett charakterisiert, beinhaltet jedoch zwei bekannte regulatorische Elemente. Das erste Element besteht aus einer AGAGGA-Sequenz, die 30 nt *upstream* des Transkriptionsstarts liegt. Die zweite wichtige Sequenz ist ein UAA, welches 10 nt *downstream* des Transkriptionsstarts liegt. Im SFV-Genom liegt die AGAGGA-Sequenz innerhalb des Leserahmens der Nicht-Strukturproteine (nSP). Um leichter Aptamersequenzen in den Promotor einsetzen zu können, wurde der subgenomische Promotor innerhalb des Leserahmens der nSP still mutiert, um die Aminosäuresequenz nicht zu verändern. Zwischen dem Leserahmen der nSP und der SP wurde ein neuer minimaler subgenomischer Promotor eingefügt. Dieser beinhaltet 40 nt *upstream* und 20 nt *downstream* des Transkriptionsstarts und zeigt eine dem natürlichen Promotor ähnliche Transkriptionsrate (40/20 Promoter). Innerhalb dieses zusätzlichen Promotors wurde nun ein Tetrazyklin bindendes Aptamer inseriert. Für das erste Konstrukt „Tc vor SG“ wurde das Aptamer 2 nt 5' der AGAGGA-Sequenz eingefügt. Für das „Tc AGA“-Konstrukt wurde die AGAGGA-Sequenz in den P1-Stamm des Aptamers integriert. Diese beiden Konstrukte

sollen die Zugänglichkeit der AGAGGA-Region und damit Wechselwirkung der viralen Polymerase mit dieser Region regulieren.

Ein drittes Konstrukt beinhaltet das Tetrazyklin bindende Aptamer 6 nt 5' des Startcodons der SP bzw. in unserem Konstrukt 5' des Startcodons von eGFP. Hier soll durch das Aptamer die Zugänglichkeit des Startcodons für das Ribosom kontrolliert werden.

Alle Konstrukte wurden in den Vektor pSFV-RD-eGFP kloniert.

4.2.1.1 Klonierung der Tc vor AUG-Konstrukte in pSFV-RD-eGFP

Als Ausgangsvektor diente der Vektor pSFV-RD-eGFP (Abbildung 4-12). Dieser enthält das Genom von SFV inklusive des 5'- und 3'-UTRs. Der Vektor codiert für die nSP. Er enthält eine Aminosäuremutation von Arginin (R) zu Aspartat (D) in nSP2, welche die zytotoxische Aktivität des Virus senkt. Des Weiteren codiert der Vektor für eGFP statt der SP und Fragmente des Capsidproteins hinter dem subgenomischen Promotor. Zusätzlich codiert der Vektor für eine Ampicillinresistenz.

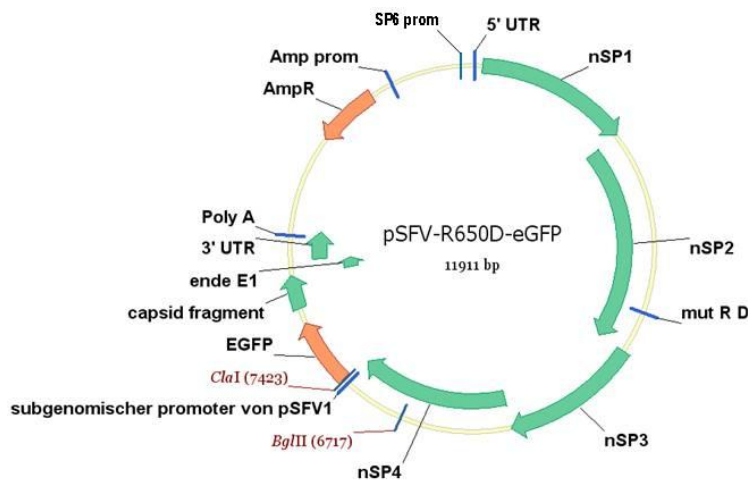


Abbildung 4-12: Vektorkarte des Ausgangsvektors pSFV-RD-eGFP.

Der Vektor enthält die Nicht-Strukturgene (nSP) 1 – 4 unter einem SP6 Promotor (SP6 prom), *downstream* des 5'-UTRs, sowie das Gen für eGFP (orange) und einen Teil des Gens für das Capsidprotein (Capsid Fragment). Die Ampicillinresistenz (AmpR) ist *antisense* codiert. Gene und funktionale Elemente sind als Pfeile dargestellt.

Die 400 bp langen Fragmente mit dem mutierten subgenomischen Promotor (SG mut) und dem neuen subgenomischen Promotor (SG) und einem 40 nt langen Überlapp zu nSP4 wurden als Gensynthese von MWG Eurofins bezogen. Folgende Fragmente wurden bestellt: SG mut + SG (40/20), SG mut + Tc apt vor SG (40/20), SG mut + Tc apt- AGA SG (40/20), SG mut + SG (40/20)+ Tc apt vor ATG. Für die Klonierung der Kontrolle mit dem zusätzlichen Promotor wurde das Fragment SG mut + SG (40/20) verwendet. Für die Klonierung des Konstrukts „Tc vor SG“ das Fragment SG mut + Tc apt vor SG (40/20), für „Tc AGA“ das Fragment SG mut + Tc apt- AGA SG (40/20) und für „Tc vor AUG“ das Fragment SG mut + SG (40/20)+ Tc apt vor ATG verwendet.

Ergebnisse

Die gelieferten Plasmide dienten als Matrize für eine PCR mit den Oligonukleotiden Fwd_SFV SG/GFP und Rev_SFV SG/GFP, welche am Rand der gekauften Sequenz binden. Des Weiteren wurde die Region 5' der zu klonierenden Region innerhalb des nSP4 Proteins mit den Oligonukleotiden Fwd_SFV NSP4 und Rev_SFV NSP4 und der Matrize pSFV-RD-eGFP amplifiziert. Die PCR-Fragmente wurden in einer weiteren *overlap* PCR zu einem großen Fragment vereinigt. Das PCR-Produkt und der Vektor pSFV-RD-eGFP wurden mit ClaI und BglII geschnitten und ligiert. *E. coli* Top10 wurde mit dem Ligationsansatz transformiert. Die Insertion der Konstrukte in der gewünschten Orientierung sowie der Ausschluss von Sekundärmutationen wurde mittels Sequenzierung mit dem Oligonukleotid Fwd_SFV NSP4 bestätigt. Für die erhaltenen Vektoren sind stellvertretend in Abbildung 4-13 der Vektor pSFV-RD-eGFP SGmut und in Abbildung 4-14 pSFV-RD-eGFP_SGmut-Tc vor AUG dargestellt.

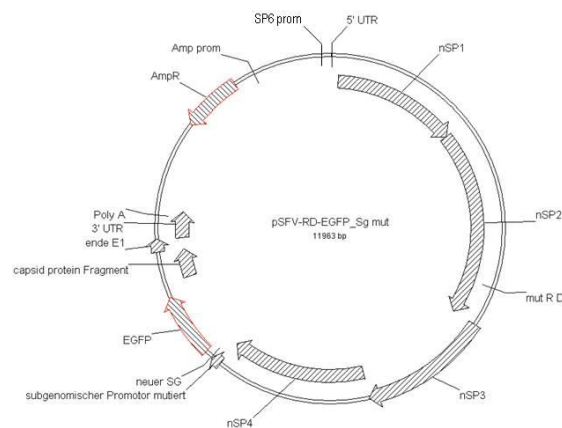


Abbildung 4-13: Vektorkarte für den Kontrollvektor pSFV-RD-eGFP_Sg mut.

Der Vektor enthält die Nicht-Strukturgene (nSP) 1 – 4 unter einem SP6 Promotor (SP6 prom), *downstream* des 5'-UTRs, sowie das Gen für eGFP und einen Teil des Gens für das Capsidprotein. Der subgenomische Promotor innerhalb von nSP4 wurde still mutiert und ein neuer subgenomischer Promotor (neuer SG) zwischen nSP4 und eGFP eingefügt. Die Ampicillinresistenz (AmpR) ist *antisense* codiert. Gene und funktionale Elemente sind als Pfeile dargestellt.

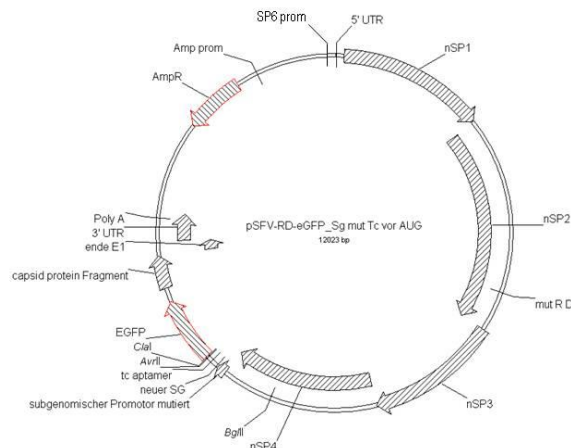


Abbildung 4-14: Vektorkarte für pSFV-RD-eGFP_Sg mut Tc vor AUG mit dem „Tc vor AUG“-Konstrukt.

Der Vektor enthält die Nicht-Strukturgene (nSP) 1 – 4 unter einem SP6 Promotor (SP6 prom), *downstream* des 5'-UTRs, sowie das Gen für eGFP und einen Teil des Gens für das Capsidprotein. Der subgenomische Promotor innerhalb von nSP4 wurde still mutiert und ein neuer subgenomischer Promotor (neuer SG) zwischen nSP4 und eGFP zusammen mit dem Tetrazyklin bindenden Aptamer (Tc Aptamer) eingefügt. Die Ampicillinresistenz (AmpR) ist *antisense* codiert. Gene und funktionale Elemente sind als Pfeile dargestellt.

4.2.1.2 Analyse der Replikationsregulation über die GFP-Expression mittels Western Blot

Die RNA aller Konstrukte wurden *in vitro* mit einer run-off Transkription hergestellt und in BHK-Zellen elektroporiert, welche virale Replikonpartikel (VRP) produzierten. Die VRPs wurden mit einer MOI von 1 eingesetzt, um neue BHK-Zellen zu infizieren. Die Zellen wurden vor der Infektion 1 h mit 50 μ M Tetrazyklin vorinkubiert. 24 h nach der Infektion wurden die Proteine der Zellen präpariert und GFP und β -Aktin als Ladekontrolle über Westernblot analysiert.

Die anfängliche Detektion der GFP-Expression über FACS führte durch die breite Anregung der Fluoreszenz in An- und Abwesenheit von Tetrazyklin zu unterschiedlichen Populationspositionen. Die Detektion der GFP-Expression erfolgte deshalb über Western Blots.

In Abbildung 4-15 ist exemplarisch ein Western Blot für die drei Konstrukte gezeigt.

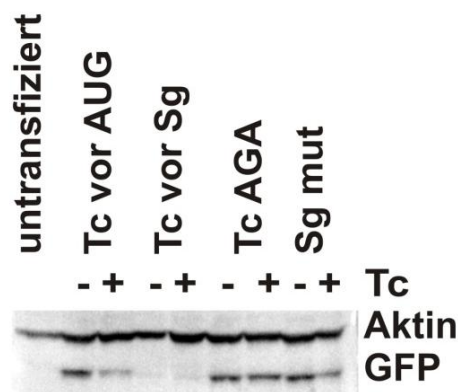


Abbildung 4-15: Exemplarischer Western Blot für die Konstrukte mit dem Tetrazyklin bindenden Aptamer im Bereich des subgenomischen Promotors.

Von links nach rechts ist gezeigt: Zellen untransfiziert, mit „Tc vor AUG“-Konstrukt (Tc vor AUG), mit „Tc vor SG“-Konstrukt (Tc vor sg), mit „Tc AGA“-Konstrukt (Tc-AGA) und mit einem Konstrukt mit dem minimalen subgenomischen Promotor aber ohne Aptamer (Sg mut) infizierte Zellen, jeweils ohne (-) und mit (+) 50 μ M Tetrazyklin (Tc) im Medium. Detektiert wurde die Chemolumineszenz von β -Aktin als Ladekontrolle und des viral exprimierten GFPs. Der Versuch wurde dreimal reproduziert.

Aus Abbildung 4-15 ist ersichtlich, dass die nicht infizierten Zellen kein GFP exprimierten. Zellen, die mit dem Kontrollvirus transfiziert wurden (minimalen subgenomischen Promotor ohne Aptamer, Sg mut) exprimierten GFP. Die Expression wurde aber durch die Zugabe von Tetrazyklin geringfügig gesenkt, was auf einen generellen Einfluss von Tetrazyklin auf die Vitalität der Zellen hindeutet. Überhaupt konnte beobachtet werden, dass die Infektion der Zellen trotz Einsatz einer SFV-Mutante, die geringere Zytotoxizität aufweisen sollte, zu einer hohen Sterblichkeit der Zellen führte, vor allem bei zusätzlicher Tetrazyklinzugabe. Die Infektion wurde dreimal durchgeführt und lieferte vergleichbare Ergebnisse.

Bei dem „Tc AGA“-Konstrukt war keine Abnahme der GFP-Expression durch Zugabe von Tetrazyklin zu beobachten. Die mit dem „Tc vor AUG“-Konstrukt infizierten Zellen exprimierten dagegen ohne Tetrazyklin GFP viel stärker als die Zellen in Anwesenheit von

Tetrazyklin. Werden diese beiden Konstrukte verglichen, so ist bei dem Konstrukt „Tc vor AUG“ eine klare Abnahme zu beobachten.

In dem „Tc vor SG“-Konstrukt stört das Aptamer den Zugang zum subgenomischen Promotor auch in Abwesenheit von Tetrazyklin, sodass es kaum zur GFP-Expression kommt.

Es sollte weiterhin überprüft werden, ob es sich bei der Abnahme der GFP-Expression bei dem „Tc vor AUG“-Konstrukt um einen Einfluss auf die Replikation oder die Translation handeln könnte. Hierzu wurde aus infizierten Zellen RNA präpariert und die Menge an genomischer und subgenomischer mRNA in der Zelle über qRT-PCR bestimmt. Die Daten der qPCR sind in Abbildung 4-16 gezeigt.

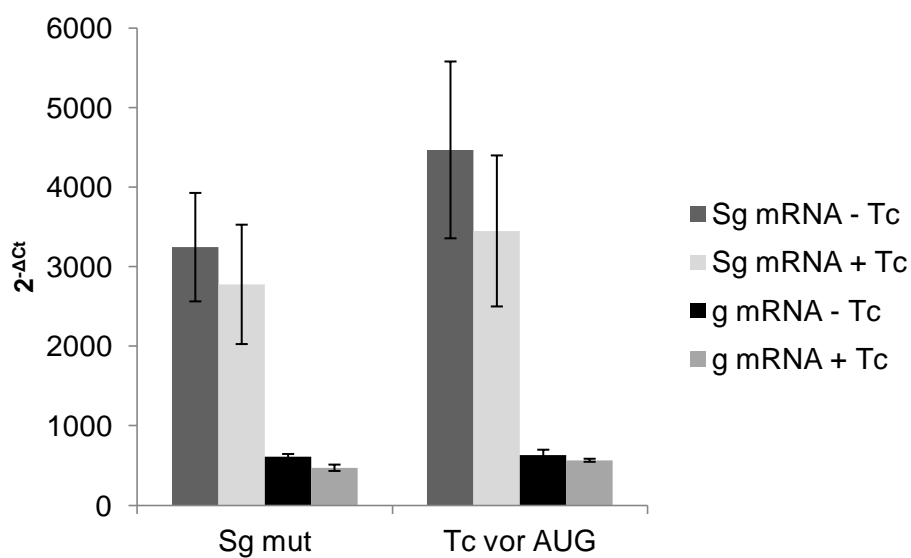


Abbildung 4-16: qRT-PCR Daten für die Analyse der subgenomischen mRNA-Menge (Sg mRNA) und der genomischen RNA-Menge (nSP).

BHK Zellen wurden mit VRP für die Kontrolle (Sg mut) und das Konstrukt „Tc vor AUG“ infiziert und die subgenomische mRNA-Menge mit einem in GFP bindenden Primerpaar und die genomische mRNA-Menge (nSP) mit einem innerhalb der nSP-Gene bindenden Primerpaar mit einer qRT-PCR analysiert. Hier sind die Mittelwerte drei unabhängigen Messungen mit Triplikaten und deren Standardabweichung als Fehlerbalken gezeigt.

Die genomische RNA wurde mit Primern detektiert, die im Bereich der *nSP*-Gene binden. Die subgenomische mRNA wurde über Primer detektiert, die im Bereich von *gfp* binden. Die *gfp* bindenden Primer detektieren jedoch zusätzlich zur subgenomischen auch die genomische RNA, weshalb die Signale dieser Primer stärker waren.

Aus Abbildung 4-16 ist ersichtlich, dass die RNA-Menge durch die Zugabe von Tetrazyklin für die „Tc vor AUG“-Konstrukte nicht beeinflusst wurde, was auf einen Translationseffekt schließen lässt.

4.2.2 Optimierung der Regulation durch das Tetrazyklin bindenden Aptamer

Der beobachtete Effekt des „Tc vor AUG“-Konstrukts ist im Vergleich zu dem Kontrollkonstrukt nur gering und sollte deshalb optimiert werden. Hierzu wurden neue Konstrukte entworfen, welche auf dem „Tc vor AUG“-Konstrukt aufbauen. Die neuen Konstrukte sind schematisch in Abbildung 4-17 dargestellt.

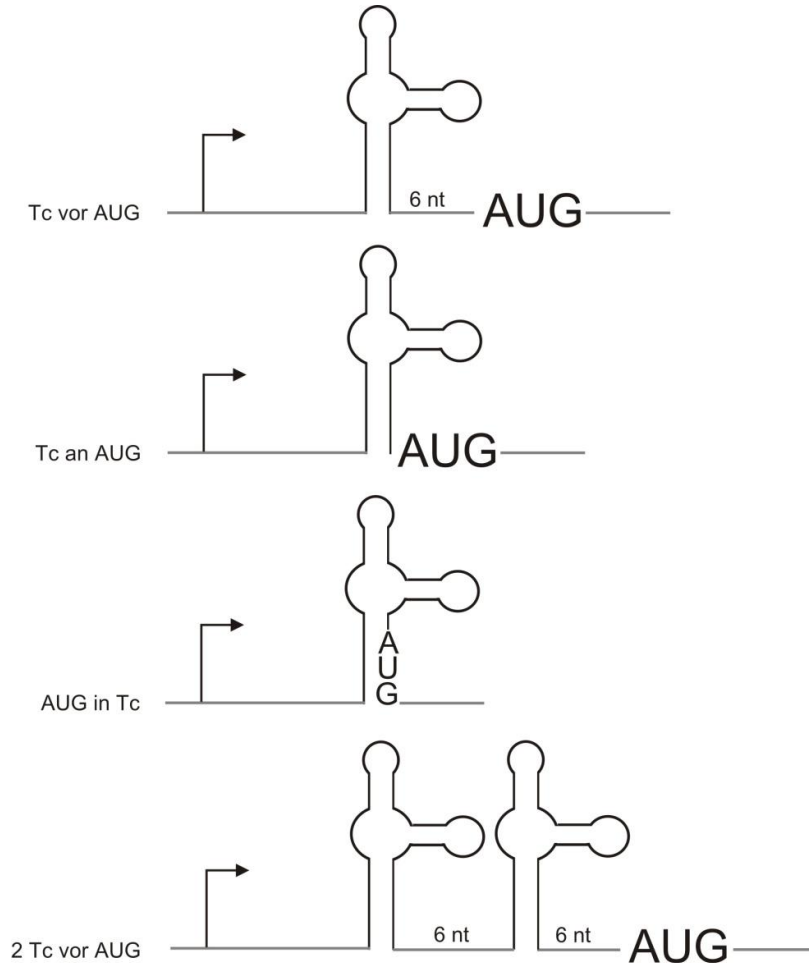


Abbildung 4-17: Schematische Darstellung der neuen Konstrukte mit dem Tetrazyklin bindenden Aptamer im Bereich des Startcodons basierend auf dem Tc vor AUG-Konstrukt.

Der Pfeil kennzeichnet den Transkriptionsstart. Oben ist das Ausgangskonstrukt Tc vor AUG gezeigt. Im ersten Konstrukt wurde das Aptamer direkt an das Startcodon gesetzt (Tc an AUG) bzw. im zweiten Konstrukt das Startcodon in den P1-Stamm des Aptamers integriert (AUG in Tc). Im dritten Konstrukt wurde ein zweites Tetrazyklin bindendes Aptamer 6 nt *upstream* des ersten eingefügt.

In den neuen Konstrukten wurde das Aptamer, welches zuvor 6 nt *upstream* des Startcodons inseriert war, direkt an das Startcodon gesetzt („Tc an AUG“). In einem weiteren Konstrukts („AUG in Tc“) wurde das Startcodon in den P1-Stamm des Aptamers integriert, um eine stärkere Kontrolle der Zugänglichkeit des Startcodons für das Ribosom zu erreichen. Im „2Tc vor AUG“-Konstrukt wurde ein zweites Tetrazyklin bindendes Aptamer 6 nt *upstream* des Aptamers im „Tc vor AUG“-Konstrukt inseriert, sodass zwei Aptamere in Anwesenheit von Tetrazyklin den Zugang zum Startcodon blockieren.

Die neuen Konstrukte wurden in den Vektor pSFV-RD-eGFP_Sg mut Tc vor AUG kloniert (Abbildung 4-14).

4.2.2.1 Klonierung der neuen Tc vor AUG Konstrukte

Für die Klonierung des Konstrukts mit dem Tetrazyklin bindenden Aptamer direkt 5' vom Startcodon und des Konstrukts mit dem Startcodon im P1-Stamm des Tetrazyklin bindenden Aptamers wurde als Ausgangsvektor der in Kap. 4.2.1.1 klonierte Vektor pSFV-RD-eGFP_Sg mut Tc vor AUG verwendet.

Die Konstrukte wurden mit einer PCR mit den Oligonukleotiden Fwd_SFV SG/GFP und Rev_SFV Sg mut tc an ATG bzw. den Oligonukleotiden Fwd_SFV AUG in Tc (ÜH Sg neu) und Rev_SFV AUG in Tc (ÜH GFP) mit dem Plasmid pSFV-RD-eGFP_Sg mut Tc vor AUG als Matrize durchgeführt. Des Weiteren wurde das eGFP-Gen in einer PCR mit den Oligonukleotiden Fwd_SFV GFP und Rev_SFV hinter GFP/XmaI über das Plasmid pSFV-RD-eGFP_SGmut Tc vor AUG amplifiziert. Für das Konstrukt AUG in Tc wurde eine weitere PCR über den subgenomischen Promotor und nSP4 mit den Oligonukleotiden Fwd_SFV SG/GFP und Rev_SFV sg neu durchgeführt. Die überlappenden PCR-Produkte wurden in einer *overlap* PCR vereinigt und anschließend zusammen mit dem Vektor pSFV-RD-eGFP_Sg mut Tc vor AUG mit den Restriktionsenzymen BamHI und XmaI geschnitten und ligiert. *E. coli* Top10 wurde mit dem Ligationsansatz transformiert. Die Insertion der Konstrukte in der gewünschten Orientierung sowie der Ausschluss von Sekundärmutationen wurde mittels Sequenzierung mit dem Oligonukleotid Fwd_SFV SG/GFP bestätigt. Der Vektor pSFV-RD-eGFP_SGmut-Tc an AUG ist stellvertretend in Abbildung 4-18 dargestellt.

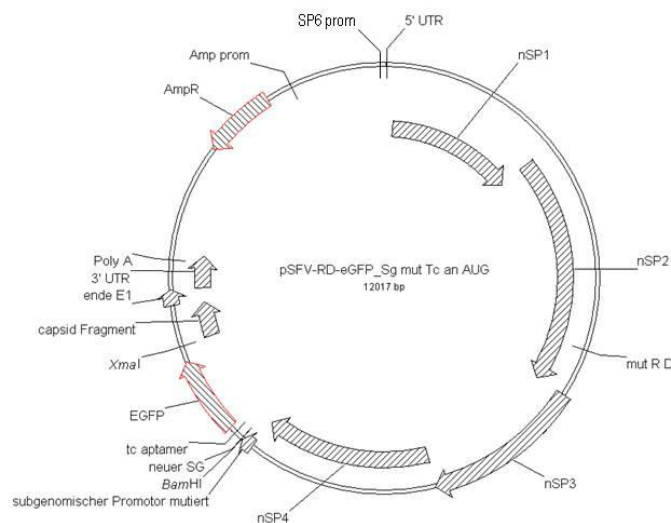


Abbildung 4-18: Vektorkarte für pSFV-RD-eGFP_Sg mut Tc an AUG mit dem „Tc an AUG“-Konstrukt. Der Vektor enthält die Nicht-Strukturgene (nSP) 1 – 4 unter einem SP6 Promotor (SP6 prom), *downstream* des 5' UTRs, sowie das Gen für eGFP und einen Teil des Gens für das Capsidprotein. Der subgenomische Promotor innerhalb von nSP4 wurde still mutiert und ein neuer subgenomischer Promotor (neuer SG) zwischen nSP4 und eGFP zusammen mit dem Tetrazyklin bindenden Aptamer (Tc Aptamer) eingefügt. Die Ampicillinresistenz (AmpR) ist *antisense* codiert. Gene und funktionale Elemente sind als Pfeile dargestellt.

4.2.2.2 Klonierung des 2Tc vor AUG-Konstrukts

Als Ausgangsvektor diente der in Kap. 4.2.1.1 klonierte Vektor pSFV-RD-eGFP_Sg mut Tc vor AUG.

Für das Konstrukt mit zwei Tetrazyklin bindenden Aptameren in der Nähe des Startcodons wurde das Fragment aus den beiden um 20 nt überlappenden Fragmenten Frag_fwd 2tc vor AUG und Frag_rev 2tc vor AUG in einer PCR ohne Matrize hergestellt. Das entstandene Fragment und der Vektor pSFV-RD-eGFP_Tc vor AUG wurden mit ClaI und AvrII geschnitten und ligiert. *E. coli* Top 10 wurde mit dem Ligationsansatz transformiert. Die Insertion der zwei Aptamere in der gewünschten Orientierung sowie der Ausschluss von Sekundärmutationen wurde mittels Sequenzierung mit dem Oligonukleotid Fwd_SFV SG/GFP bestätigt. In Abbildung 4-19 ist der Vektor pSFV-RD-eGFP_SGmut-2Tc vor AUG dargestellt.

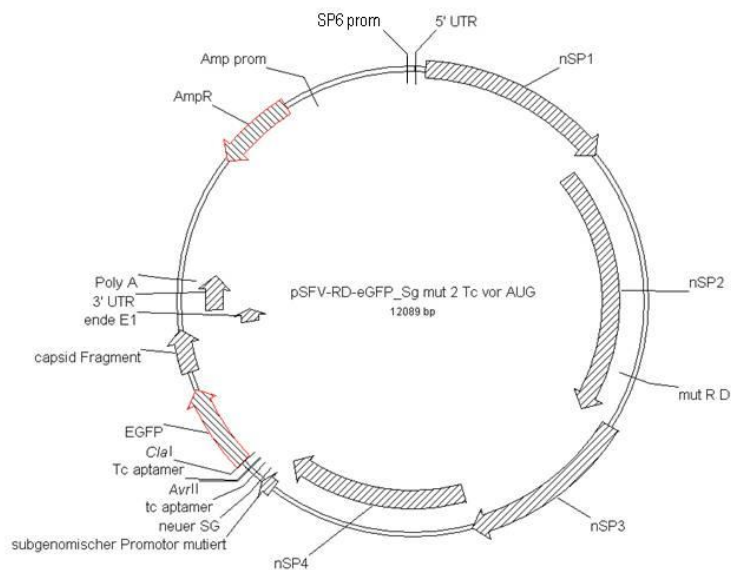


Abbildung 4-19: Vektorkarte für pSFV-RD-eGFP_Sg mut 2tc vor AUG mit dem „2TC vor AUG“-Konstrukt. Der Vektor enthält die Nicht-Strukturgene (nSP) 1 – 4 unter einem SP6 Promotor (SP6 prom), *downstream* des 5'-UTRs, sowie das Gen für eGFP und einen Teil des Gens für das Capsidprotein. Der subgenomische Promotor innerhalb von nSP4 wurde still mutiert und ein neuer subgenomischer Promotor (neuer SG) zwischen nSP4 und eGFP zusammen mit zwei Tetrazyklin bindenden Aptameren (Tc Aptamer) eingefügt. Die Ampicillinresistenz (AmpR) ist *antisense* codiert. Gene und funktionale Elemente sind als Pfeile dargestellt.

4.2.2.3 Analyse der GFP-Expression der optimierten Konstrukte mittels Western Blot

Die neuen Konstrukte wurden wie in Kap.4.2.1.2 beschrieben in VRP verpackt und zur Infektion von BHK-Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden vor der Infektion 1 h mit 50 µM Tetrazyklin vorinkubiert. 24 h nach Transfektion wurde die GFP-Expression mittels Western Blot analysiert. Die Infektion wurde zweimal durchgeführt und zeigte ähnliche Ergebnisse. Ein Westernblot ist exemplarisch in Abbildung 4-20 gezeigt.

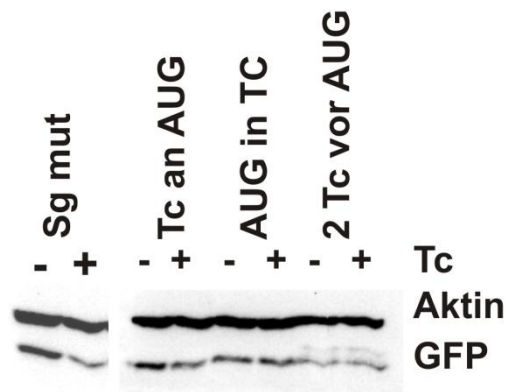


Abbildung 4-20: Exemplarischer Westernblot für die Konstrukte „Tc an AUG“, „AUG in Tc“ und „2Tc vor AUG“.

Von links nach rechts ist gezeigt: mit dem Kontrollvirus (Sg mut), mit dem Tc an AUG-Konstrukt (Tc an AUG), mit dem Konstrukt mit dem AUG im Stamm des Aptamers (AUG in Tc) und mit dem Konstrukt mit zwei Aptameren vor dem Startcodon (2 Tc vor AUG) infizierte Zellen jeweils ohne (-) und mit (+) 50 µM Tetrazyklin (Tc) im Medium. Die Kontrolle wurde parallel im gleichen Versuch auf einem zweiten Gel mitgeführt. Detektiert wurde hier die Chemolumineszenz von β -Aktin als Ladekontrolle und das viral exprimierte GFP. Der Versuch wurde zweimal reproduziert.

Aus Abbildung 4-20 ist ersichtlich, dass die GFP-Expression in der Kontrolle (Sg mut) bei Tetrazyklinzugabe geringfügig abgesenkt wurde. Im „Tc an AUG“-Konstrukt war im Vergleich zur Kontrolle keine Regulation der GFP-Expression beobachtbar. Bei dem „AUG in Tc“-Konstrukt und „2 Tc vor AUG“-Konstrukt konnte kein Unterschied in der GFP-Expression bei An- und Abwesenheit von Tetrazyklin detektiert werden. Bei dem Konstrukt mit zwei Aptameren vor dem Startcodon ist eine zweite schwächere GFP-Bande erkennbar. Die 6 nt lange Sequenz zwischen den Aptameren enthält ein zusätzliches Startcodon *in frame*, was die Expression einer längeren und kürzeren GFP-Variante bedingt. Beide Banden sind jedoch schwach und verändern sich nicht mit Tetrazyklinzugabe. Keines der neuen Konstrukte zeigt einen stärkeren Regulationseffekt als das ursprüngliche „Tc vor AUG“-Konstrukt.

Mit den ursprünglichen Konstrukten konnte nur eine geringfügige, Tetrazyklin-abhängige Regulation erreicht werden, die auch durch neue Konstrukte nicht verbessert werden konnte.

4.2.3 Optimierung der Infektionsbedingungen

Das virale System zur Herstellung und Infektion mit SFV wurde in unserem Labor während dieser Arbeit neu etabliert. Während der Versuche zeigte sich, dass diese nur bedingt reproduzierbar waren, da die Infektionsrate schwankte. Die Infektion sollte deshalb optimiert werden. Hierzu wurde das „Tc vor AUG“-Konstrukts verwendet.

Bei den bisher beschriebenen Infektionen wurde in jedem Versuch eine MOI von 1 verwendet. Allerdings konnte anhand der GFP-Fluoreszenz nach der Transfektion beobachtet werden, dass die Transfektionseffizienz in unterschiedlichen Ansätzen stark schwankte. Zusätzlich induziert SFV einen zytotoxischen Effekt in BHK-Zellen. Dieser führt

dazu, dass die Zellen sich abkugeln, vom Untergrund ablösen und schließlich Apoptose begehen. Zellen, die mit Tetrazyklin inkubiert wurden, zeigten einen stärkeren zytotoxischen Effekt als Zellen in Abwesenheit von Tetrazyklin. Dies ist wahrscheinlich auf den zusätzlichen Stress durch die Anwesenheit von Tetrazyklin zurückführbar. Allerdings folgt hieraus, dass bei den Transfektionen mit Tetrazyklin mehr infizierte Zellen starben als in Abwesenheit von Tetrazyklin, was die Ergebnisse in der GFP-Detektion verfälschen kann. Zusätzliche Schritte, wie die Präparation des Proteinextraktes und das Blotten, stellten sich als große Fehlerquelle herausstellen und sollten vermieden werden. Deshalb wurde trotz der bei den FACS-Messungen beobachteten Interferenz der Tetrazyklin- mit der GFP-Fluoreszenz nun versucht, GFP mit einem Fluorometer direkt zu detektieren. Im Fluorometer konnte exakt die GFP-Fluoreszenz angeregt und detektiert werden, weshalb die Tetrazyklin-Fluoreszenz hier weniger störte als im breit anregenden FACS.

4.2.3.1 Anpassung der MOI

Bisher wurde eine MOI von 1 verwendet. Hierbei wird ein VRP pro Zelle eingesetzt. Durch visuelle Kontrolle der grün fluoreszierenden Zellen am Fluoreszenzmikroskop konnte die Infektionseffizienz abgeschätzt werden. Bei einer MOI von 1 wurde eine Infektionsrate von ca. 30% bestimmt. Um eine höhere Infektionsrate zu erreichen, wurden höhere MOIs getestet. Bei einer MOI von 3 wurde eine Infektionsrate von ca. 60% erreicht und bei einer MOI von 5 ca. 80%. Für die weiteren Versuche wurde eine MOI von 5 verwendet.

4.2.3.2 Anpassung der Inkubationszeit

Bisher wurden die Zellen 1 h vor der Infektion mit Tetrazyklin vorinkubiert, damit Tetrazyklin sich bereits in den Zellen befindet, wenn sie infiziert werden. Die virale Replikation kann dann direkt blockiert werden und somit gar nicht erst starten.

Die Zellen waren durch die doppelte Belastung von Tetrazyklin und Infektion jedoch so stark gestresst, dass immer ein Teil der Zellen starb. Daher wurde die Vorinkubation mit Tetrazyklin gestoppt und die Tetrazyklinzugabe erfolgte 45 min nach Abschluss der Infektion. Somit wurde den Zellen Zeit gegeben, sich nach der Infektion zu regenerieren, bevor die Tetrazyklin Zugabe erfolgte. Da die virale Replikation jedoch in den ersten drei Stunden nach der Transfektion startet, sollte das Regenerationsfenster nicht zu groß gewählt werden.

Nach 24 h konnte bereits ein zytotoxischer Effekt beobachtet werden, weshalb die Inkubationszeit der Zellen vor der Analyse der GFP-Expression verkürzt wurde. 6 h nach der Infektion war die GFP-Expression jedoch noch zu gering, um eindeutig detektiert zu werden. Die Inkubationszeit wurde auf 16 h erhöht, da hier noch keine zytotoxischen Effekte beobachtbar, die GFP-Expression jedoch gut detektierbar war.

4.2.3.3 mCherry-Kontrolle

Um eine Möglichkeit zu haben, auf die Infektionsrate zu normieren, wurde ein Kontrollkonstrukt kloniert, welches die Detektion der Infektionseffizienz ermöglicht. In diesem Kontrollkonstrukt wurde der Leserahmen von GFP gegen den von mCherry ausgetauscht. Dieses Konstrukt kann kotransfiziert werden und ermöglicht durch die zusätzliche Detektion der mCherry Fluoreszenz die Normierung auf die Infektionsrate.

4.2.3.3.1 Klonierung der mCherry Kontrolle

Das Gen für das rot fluoreszierende Protein mCherry stand im Vektor 1450_pGL3-Promotor_mCherry zur Verfügung (Kap. 3.1.7). Als Ausgangsvektor diente der in Kap. 4.2.1.1 klonierte Vektor pSFV-RD-eGFP_Sg mut.

Das mCherry Gen wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden Fwd_SFV mCherry statt GFP + Clal und Rev_SFV mCherry statt GFP + Xmal amplifiziert. Durch das Oligonukleotid Fwd_SFV mCherry statt GFP + Clal wurde eine Clal-Schnittstelle und durch das Oligonukleotid Rev_SFV mCherry statt GFP + Xmal eine Xmal-Schnittstelle eingeführt. Das PCR-Produkt und der Vektor pSFV-RD-eGFP_Sg mut wurden mit den Restriktionsenzymen Clal und Xmal geschnitten und ligiert. *E. coli* Top 10 wurde mit dem Ligationsansatz transformiert. Die Insertion von mCherry in der gewünschten Orientierung sowie der Ausschluss von Sekundärmutationen wurde mittels Sequenzierung mit dem Oligonukleotid Fwd_SFV mCherry statt GFP + Clal bestätigt. Der erhaltenen Vektor ist in Abbildung 4-21 dargestellt.

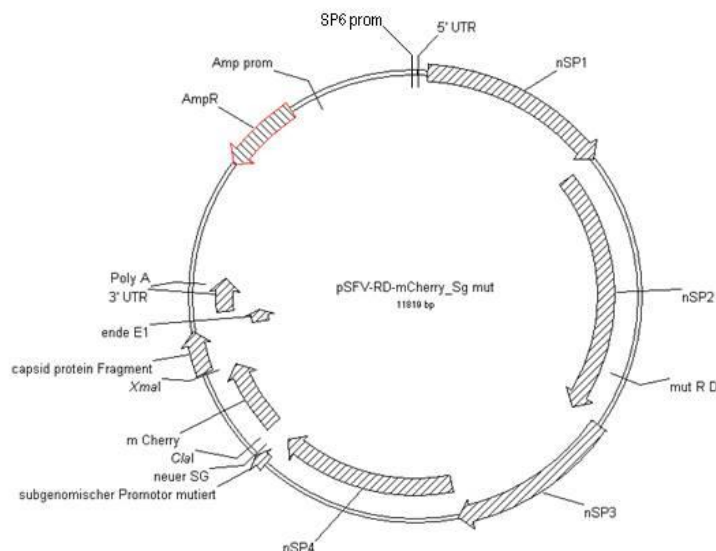


Abbildung 4-21: Vektorkarte für den mCherry exprimierenden Kontrollvektor pSFV-RD-mCherry_Sg mut. Der Vektor enthält die Nicht-Strukturgene (nSP) 1 – 4 unter einem SP6 Promotor (SP6 prom), *downstream* des 5'-UTRs, sowie das Gen für mCherry und einen Teil des Gens für das Capsidprotein. Der subgenomische Promotor innerhalb von nSP4 wurde still mutiert und ein neuer subgenomischer Promotor (neuer SG) zwischen nSP4 und mCherry eingefügt. Die Ampicillinresistenz (AmpR) ist *antisense* codiert. Gene und funktionale Elemente sind als Pfeile dargestellt.

4.2.3.4 Analyse des „Tc vor AUG“-Konstrukts unter optimierten Infektionsbedingungen

BHK-Zellen wurden mit VRPs mit dem „Tc vor AUG“-Konstrukt bzw. der Kontrolle ohne Aptamer (Sg mut) und der mCherry-Kontrolle als Infektionskontrolle koinfiziert. Hierbei wurde für die GFP-VRPs eine MOI von 5 verwendet und für die mCherry-Kontrolle eine MOI von 0,1. Da die Zellen je nur von einem VRP infiziert werden können, wurde eine sehr geringe MOI für mCherry-Kontrolle verwendet, damit diese die Infektion der GFP-Partikel nicht beeinflussen. 45 min nach der Infektion wurde Tetrazyklin zu den Zellen gegeben. Zur Optimierung der Tetrazyklinkonzentration wurden Endkonzentrationen von 0, 50, 100 und 200 μM verwendet. 16 h nach der Infektion wurde die GFP- und mCherry-Fluoreszenz vermessen. Zur Auswertung der Fluoreszenzmessungen wurden die maximalen Fluoreszenzwerte bei 510 nm bzw. 610 nm verwendet. Die GFP Fluoreszenz wurde auf die entsprechende mCherry Fluoreszenz normiert, da die nicht durch Tetrazyklin regulierte mCherry Fluoreszenz als Infektionskontrolle herangezogen werden kann. Die Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt und reproduziert. Das zusammengefasste Ergebnis aller Messungen ist in Abbildung 4-22 dargestellt.

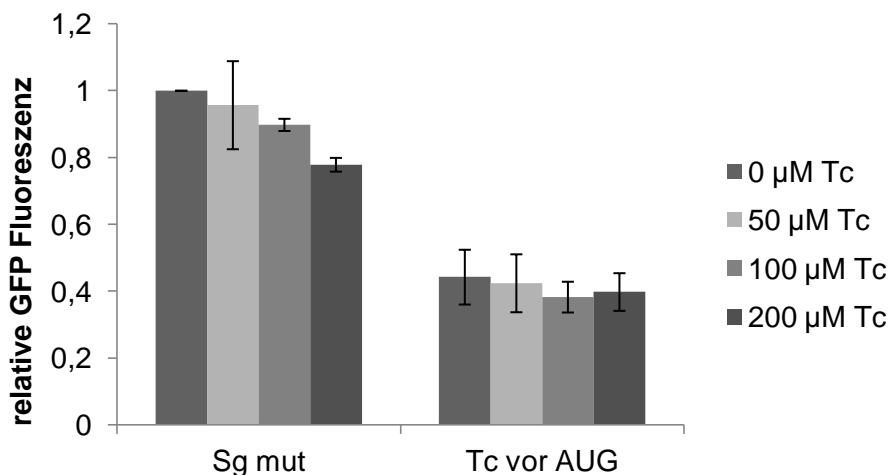


Abbildung 4-22: GFP Fluoreszenzmessung von Kontrolle Sg mut und Tc vor AUG-Konstrukt. Aufgetragen ist die GFP Fluoreszenz normiert auf mCherry Fluoreszenz und Sg mut ohne Tetrazyklin bei Tetrazyklinkonzentrationen von 0 bis 200 μM Tetrazyklin. Es wurden zwei unabhängige Versuche in Triplikaten durchgeführt.

Die Kontrollen ohne Aptamer (Sg mut) fluoreszierten tendenziell stärker als das Konstrukt mit Aptamer. Dies lässt darauf schließen, dass das Aptamer ohne Ligand bereits eine Zugangsblockade für das Startcodon darstellt.

Die GFP-Fluoreszenz der Kontrolle „Sg mut“ sank mit steigender Tetrazyklin-Konzentration geringfügig ab. Bei dem „Tc vor AUG“-Konstrukt war in An- und Abwesenheit von Tetrazyklin keine Abnahme in der GFP-Expression mehr erkennbar. Hieraus lässt sich ableiten, dass die zuvor im Western Blot beobachteten Effekte Artefakte auf Grund der schlecht reproduzierbaren Versuchsbedingungen waren.

4.2.4 Regulation der SFV Replikation durch ein Theophyllin abhängiges hammerhead Ribozym

Ein alternativer Ansatz zur Regulation der SFV Replikation war der Einsatz eines sich selbst spaltendes Theophyllin abhängiges *hammerhead* Ribozyms. Hierzu wurde ein Konstrukt genutzt, bei dem das Ribozym mit dem Theophyllin bindenden Aptamer fusioniert ist und sich in Anwesenheit von Theophyllin selbst spaltet.⁵⁶ Dieses Ribozym wurde im 3'-UTR des SFV-Replikons inseriert.

Das SFV-Genom ähnelt einer mRNA mit 5'-Kappe und Poly A-Schwanz. Durch das Ribozym wird bei dessen Selbstspaltung der Poly-A Schwanz entfernt und somit das SFV-Genom in der Wirtszelle abgebaut. Dieser Schalter ist im Gegensatz zu den auf dem Tetrazyklin bindenden Aptamer basierenden Schaltern nicht reversibel, sondern ermöglicht nur ein Ausschalten der Virusreplikation.

Das Theophyllin abhängige *hammerhead* wurde vor das 3'-Ende des minimalen SFV Genoms mit eGFP als Reporterproteine gesetzt. Das Konstrukt ist schematisch in Abbildung 4-23 gezeigt.

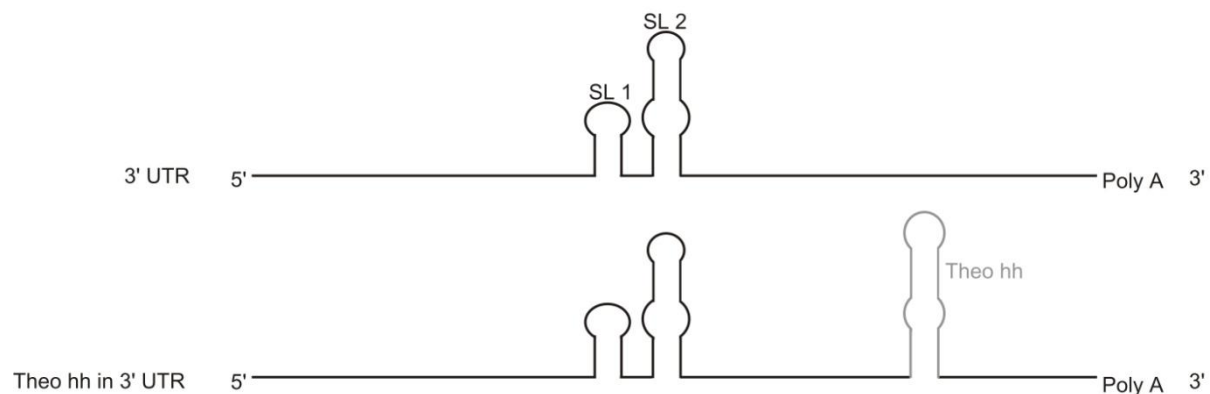


Abbildung 4-23: Schematische Darstellung des Konstrukts mit dem Theophyllin abhängigen *hammerhead* Ribozym (Theo hh in grau) im 3'-UTR des SFV-Genoms.

Oben ist die berechnete Struktur des 3'-UTRs des SFV-Genoms mit PolyA-Schwanz (Poly A) gezeigt und unten der 3'-UTR mit dem Theophyllin abhängigem *hammerhead* im 3'-Bereich des UTRs.

Der 3'-UTR des SFV-Genoms weist Sekundärstrukturen auf. Bisher wurden noch keine Strukturanalysen durchgeführt, sodass auf eine berechnete Strukturvorhersage zurückgegriffen werden musste. Diese ist schematisch in Abbildung 4-23 gezeigt. Im mittleren Teil des UTRs befinden sich zwei Stammeschleifenstrukturen. Das Theophyllin abhängige *hammerhead* Ribozym wurde 50 nt *downstream* der erwarteten Strukturen in den 3'-UTR eingefügt, um die bestehenden Strukturen möglichst nicht zu beeinflussen. Die letzten 30 nt des 3'-UTRs dienen als Promotor für die Synthese des Antigenoms. Um den Zugang zu dieser Sequenz nicht zu stören, wurde das Ribozym 50 nt *upstream* des 3'-Ende des UTRs inseriert.

4.2.4.1 Zytotoxizitätstest für Theophyllin

Es ist bekannt, dass Theophyllin für humane Zellen toxisch ist. In ersten Versuchen mit BHK-Zellen wurde eine hohe Sterblichkeit der Zellen beobachtet. Zur Untersuchung der Zellviabilität in Anwesenheit von Theophyllin wurde ein MTT-Test durchgeführt. Hierzu wurden BHK-Zellen mit für 24 h bzw. 48 h mit unterschiedlichen Theophyllinkonzentrationen inkubiert und der Anteil der lebenden Zellen über die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-24 gezeigt.

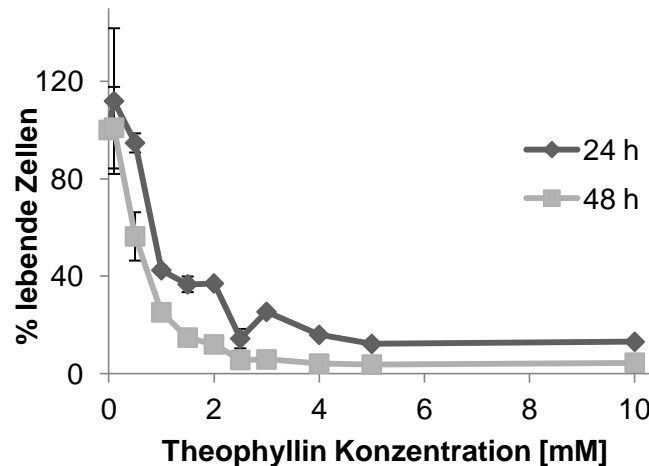


Abbildung 4-24: Zellviabilitätstest in BHK21 Zellen.

Gezeigt sind Triplikate in Anwesenheit von 0 bis 10 mM Theophyllin für 24 h (dunkel grau) bzw. 48 h (hell grau). Es wurden zwei unabhängige Versuche in Triplikaten durchgeführt.

Aus dem MTT-Test in BHK-Zellen war deutlich ersichtlich, dass bereits nach 24 h bei einer Theophyllinkonzentration von 0,5 mM nur noch knapp 50% der Zellen lebten.

In humanen Zellen wurde gezeigt, dass eine Theophyllinkonzentration von 1 mM für eine Repression der Reporteraktivität auf 50% benötigt wurde.⁵⁶ Für eine maximale Repression der Reporteraktivität auf 25% wären 2,5 mM Theophyllin nötig.⁵⁶ Demnach ist eine Untersuchung des Konstrukts in BHK-Zellen nicht möglich und es wurde nach einer alternativen Zelllinie mit höherer Theophyllintoleranz gesucht.

SFV wird über Mosquitos übertragen. Der Virus repliziert in diesen Zellen, induziert in Mosquitos jedoch keine zytotoxischen Effekte. Deshalb wurde die Mosquitozelllinie C6/36 mit einem MTT-Test auf die Zellviabilität in Anwesenheit von Theophyllin getestet. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-25 gezeigt.

Ergebnisse

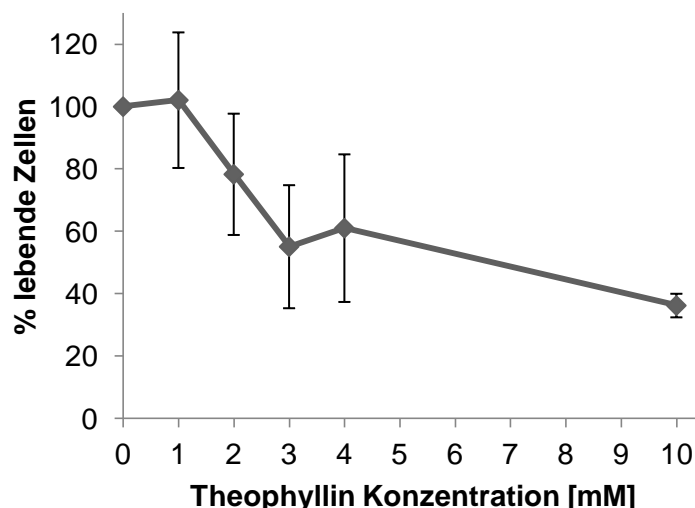


Abbildung 4-25: Zellviabilitätstest in C6/36 Mosquitozellen.

Gezeigt sind Triplikate in Anwesenheit von 0 bis 10 mM Theophyllin für 24 h. Es wurden zwei unabhängige Versuche in Triplikaten durchgeführt.

Es zeigte sich, dass die Mosquitozellen die Anwesenheit von Theophyllin wesentlich besser tolerierten als die BHK-Zellen. Sogar in Anwesenheit von 10 mM Theophyllin lebten noch 36% der Zellen. Bei der benötigten Konzentration von 2,5 mM Theophyllin lebten noch fast 70% der Zellen. Demnach wurde für die weiteren Versuche eine Theophyllinkonzentration von 2,5 mM im Medium für die Mosquitozellen gewählt.

4.2.4.2 Klonierung der Theohh in 3'-UTR Konstrukte in pSFV-RD-eGFP

Das Konstrukt wurde in den bereits in Kap. 4.2.1.1 vorgestellten Vektor pSFV-RD-eGFP kloniert.

Das 410 bp lange Fragment des 3'-UTRs mit dem Theophyllin abhängigen *hammerhead* und einem 40 nt langen Überlapp zum Leserahmens der SP wurde als Gensynthese bei MWG Eurofins bestellt.

Das gelieferte Plasmid diente als Matrize für eine PCR mit den Oligonukleotiden Fwd_3' UTR und Rev_3' UTR, welche am Rand der gekauften Sequenz binden. Des Weiteren wurde die Region 5' der zu klonierenden Region innerhalb des teilweise in pSFV verbliebenen Gens für das Capsid Protein mit den Oligonukleotiden Fwd_Capsid und Rev_Capsid und der Matrize pSFV-RD-eGFP amplifiziert. Die PCR-Fragmente wurden in einer *overlap* PCR mit den Oligonukleotiden Fwd_Capsid und Rev_3' UTR zu einem großen Fragment vereinigt. Der PCR-Ansatz wurde in den pJET-Vektor aus dem CloneJET PCR Cloning Kit von Thermo Scientific ligiert und *E. coli* Top10 mit dem Ligationsansatz transformiert. Nach erfolgreicher Sequenzierung mit dem im Kit enthaltenen Primer, wurden der pJET-Vektor und der Vektors pSFV-RD-eGFP mit XmaI und SpeI geschnitten und ligiert. *E. coli* DH5α wurde mit dem Ligationsansatz transformiert. Die Insertion des Theophyllin abhängigen *hammerhead* Fragments in der gewünschten Orientierung sowie der Ausschluss

von Sekundärmutationen wurde mittels Sequenzierung mit einem polyT-Oligonukleotid bestätigt, welches an den am 3'-Ende liegenden PolyA-Schwanz bindet. Der Vektor pSFV-RD-eGFP Theohh in 3'-UTR ist in Abbildung 4-26 dargestellt.

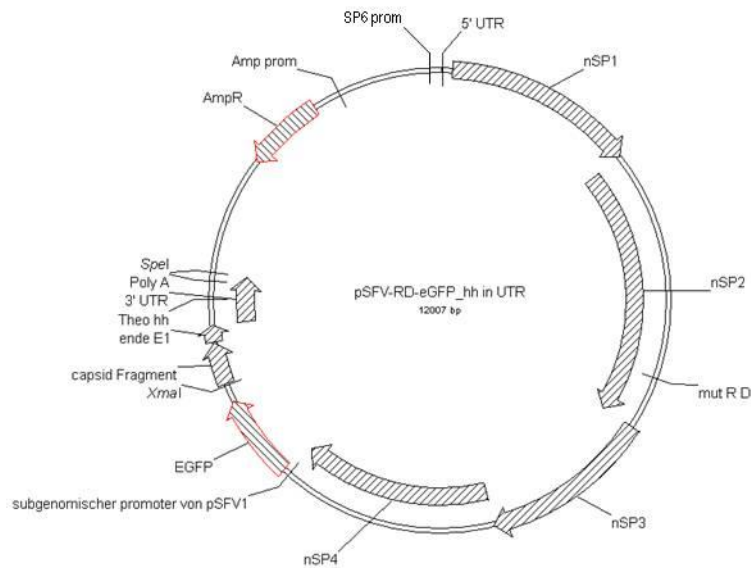


Abbildung 4-26: Vektorkarte für pSF-RD-eGFP_hh in UTR mit dem Theophyllin abhängigen *hammerhead* Ribozym im 3'-UTR.

Der Vektor enthält die Nicht-Strukturgene (nSP) 1 – 4 unter einem SP6 Promotor (SP6 prom), *downstream* des 5'-UTRs, sowie das Gen für eGFP und einen Teil des Gens für das Capsidprotein unter dem subgenomische Promotor innerhalb von nSP4. Im 3'-UTR wurde das Theophyllin abhängige *hammerhead* Ribozym (Theo hh) eingefügt. Die Ampicillinresistenz (AmpR) ist *antisense* codiert. Gene und funktionale Elemente sind als Pfeile dargestellt.

4.2.4.2.1 Klonierung des inaktiven Theohh Konstrukts

Als Kontrolle wurde ein Konstrukt mit dem inaktiven Theophyllin abhängigen *hammerhead* Ribozyms kloniert. Dieses Konstrukt enthält eine Punktmutation, welche die Aktivität des Ribozyms inhibiert.

Für die Mutagenese PCR über das Plasmid pJET_Theohh 3'-UTR mit den Oligonukleotiden Fwd_mut Theohhi in SFV UTR und Rev_mut Theohhi in SFV UTR wurde das *site directed mutagenesis Kit* von NEB verwendet. Die PCR wurde direkt ligiert und kompetente *E. coli* DH5α damit transformiert. Die Überprüfung der erfolgreichen Klonierung erfolgte durch Sequenzierung mit dem im CloneJet Kit enthaltenen Oligonukleotid. Das erhaltende Plasmid pJET_Theohhi 3'-UTR und der Vektor pSFV-RD-eGFP wurden mit XmaI und SpeI geschnitten und ligiert. *E. coli* DH5α wurde mit dem Ligationsansatz transformiert. Die Insertion des inaktiven Theophyllin abhängigen *hammerhead* Fragments in der gewünschten Orientierung sowie der Ausschluss von Sekundärmutationen wurde mittels Sequenzierung mit einem polyT-Oligonukleotid bestätigt. Der Vektor pSFV-RD-eGFP_Theohhi in UTR besitzt den gleichen Aufbau wie der in Abbildung 4-26 gezeigte Vektor.

4.2.4.3 Analyse der Replikationsregulation durch das Theophyllin abhängige hammerhead Ribozym

Die klonierten *hammerhead* Konstrukte wurden wie in Kap. 4.2.1.2 beschrieben in VRP verpackt. Die Mosquitozellen wurden mit dem Theophyllin abhängigen *hammerhead* Konstrukt enthaltenden VRP und mCherry exprimierenden VRP mit einer MOI von 2 bzw. 0,4 infiziert und 1 h nach Ende der Infektion mit 2,5 mM Theophyllin (Endkonzentration) versetzt. Die Fluoreszenz der Zellen wurde 48 h nach Infektionsstart am Fluorometer gemessen. Zusätzlich wurde eine inaktive Kontrolle (Theo hhi) mitgeführt, bei der das *hammerhead* Ribozym eine Mutation enthält, wodurch es nicht mehr in der Lage ist sich selbst zu spalten. Die auf die maximale mCherry-Fluoreszenz bei 610 nm normierten maximalen GFP-Fluoreszenzwerte bei 510 nm sind in Abbildung 4-27 gezeigt.

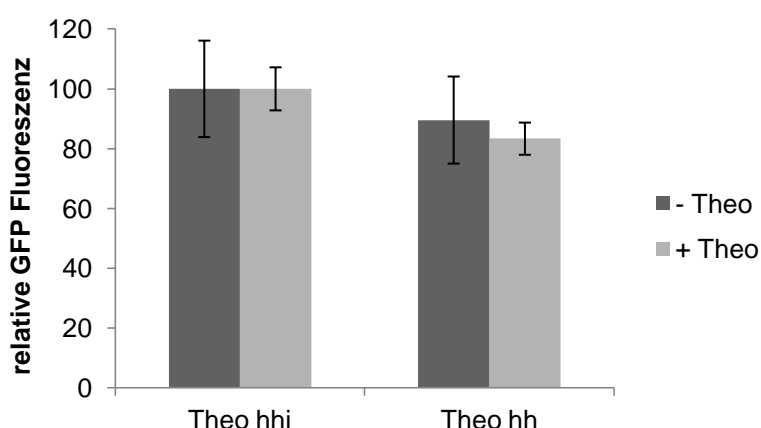


Abbildung 4-27: GFP Fluoreszenzmessung von Kontrolle mit inaktivem Theophyllin (Theo) abhängigem *hammerhead* (Theo hhi) und aktivem *hammerhead* Konstrukt (Theo hh).

Aufgetragen ist die GFP Fluoreszenz bei 510 nm normiert auf mCherry Fluoreszenz bei 610 nm und Theo hhi bei Tetrazyklinkonzentrationen von 0 (-Theo, lila) und 2,5 mM Theophyllin (+ Theo, grün) 48 h nach Infektionsstart. Durch Theophyllin wird die GFP-Expression des aktiven *hammerhead* Konstrukts auf 93% des Wertes ohne Theophyllin reduziert.

Es ist ersichtlich, dass sich die Stärke der GFP-Fluoreszenz des aktiven (Theo hh) und des inaktiven *hammerhead* Konstrukts (Theo hhi) gleichen. Wurde die maximale Fluoreszenz auf mCherry und das inaktive Konstrukt normiert (Abbildung 4-27), zeigte sich kein Unterschied in der Fluoreszenz mit und ohne Theophyllin. Demnach konnte keine Regulation der viralen Replikation durch das Theophyllin abhängige *hammerhead* Ribozym in SFV beobachtet werden.

4.3 Regulation des alternativen Spleißens durch das TetR bindende Aptamer

Ein weiterer RNA Schalter sollte für die Kontrolle des mRNA-Spleißens entwickelt werden. Hierzu wurde das TetR bindende Aptamer verwendet. Wird TetR von seinem Liganden Doxycyclin gebunden, induziert dies eine Konformationsänderung im Protein. Dadurch verschieben sich die DNA-Bindeköpfe des TetR-Dimers so gegeneinander, dass das Aptamer nicht mehr gebunden wird.

Mit dem Aptamer soll nun versucht werden, die Zugänglichkeit von Spleißstellen zu beeinflussen. Das Aptamer wird direkt *downstream* der 5'-Spleißstelle 3' des Kassettenexons inseriert. Bei dem Kassettenexon handelt es sich um ein artifizielles Exon, was sowohl inkludiert als auch exkludiert werden kann, je nach Zugänglichkeit der Spleißstellen. Bindet TetR, blockiert es den Zugang zur 5'-Spleißstelle, sodass diese nicht mehr erkannt wird. Das Kassettenexon wird demnach raus gespleißt und es kommt zu Exklusion. Bindet Doxycyclin an TetR, induziert es eine Konformationsänderung und TetR kann nicht mehr an das Aptamer binden, dadurch wird die 5'-Spleißstelle zugänglich und es kommt zur Inklusion des Kassettenexons.

Der Regulationsmechanismus des alternativen Spleißens basierend auf dem TetR bindenden Aptamer ist schematisch in Abbildung 4-28 dargestellt.

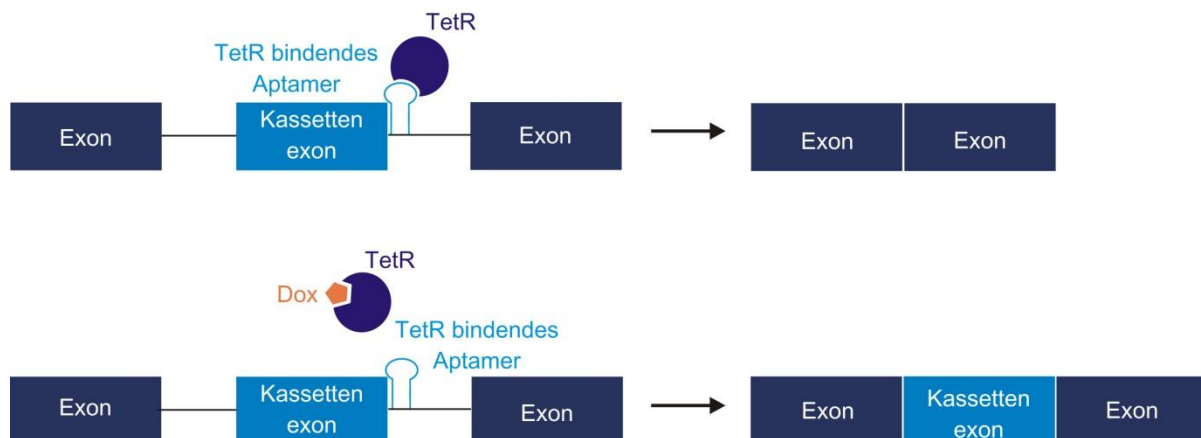


Abbildung 4-28: Schematische Darstellung des Regulationsmechanismus des alternativen Spleißens mit dem TetR bindenden Aptamer (hellblau) an der 5'-Spleißstelle im Intron 2.

Bindet TetR (lila), blockiert es den Zugang zur Spleißstelle und es kommt zur Exklusion des Kassettenexons (oben). In Anwesenheit von Doxycyclin (Dox; orange) erfährt TetR eine Konformationsänderung und bindet nicht mehr an das Aptamer, dadurch wird die 5'-Spleißstelle frei und es kommt zur Inklusion des Kassettenexons (unten).

4.3.1 Klonierung von TetR-Varianten in pWHE211

Für die Analyse des Spleißens wurde ein Vektor benötigt, der TetR mit einer Kernlokalisationssequenz exprimiert. Hier wurde die Kernlokalisationssequenz (NLS) *upstream* des N-Terminus von TetR eingefügt, damit TetR später im Zellkern vorliegt und dort das Spleißen regulieren kann.

Des Weiteren wurden Fusionsproteine von TetR erzeugt. Zum einen wurde die argininreiche Aktivator-domäne des Spleißaktivators ASF über einen Ser-Gly₄-Linker an TetR fusioniert. Zusätzlich wurde die glycinreiche Repressor-domäne des Spleißrepressors hnRNP A1 über einen Ser-Gly₄-Linker an TetR fusioniert. Diese Fusionsproteine sollten durch ihre Spleißaktivator bzw. –repressoraktivität das Spleißen zusätzlich beeinflussen, da sie durch TetR an das TetR bindende Aptamer und somit in die Nähe der Spleißstelle rekrutiert werden.

Als Ausgangsvektor diente der Vektor pWHE211_TetR-CTCF, welcher in Abbildung 4-29 dargestellt ist.

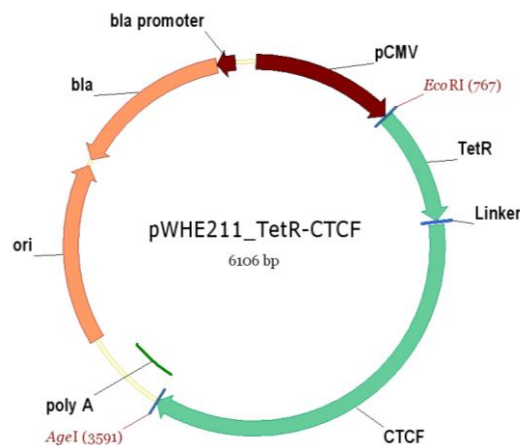


Abbildung 4-29: Vektorkarte für pWHE211_TetR-CTCF.
Das TetR-Fusionsprotein TetR-CTCF ist unter der Kontrolle eines CMV-Promotors (pCMV). Die β -Lactamase (bla) bewirkt die Ampicillinresistenz. Gene und Promotoren sind als Pfeile dargestellt.

Der Vektor pWHE211_TetR-CTCF codiert unter einem CMV-Promotor für TetR, der mit einem Ser-Gly₄-Linker an den Transkriptionsfaktor CTCF fusioniert wurde. Des Weiteren codiert der Vektor für eine β -Lactamase, welche die Ampicillinresistenz vermittelt.

4.3.1.1 Klonierung von c-myc-NLS-TetR

Aus dem Vektor pWHE211 TetR-CTCF wurde CTCF entfernt und dafür die Kernlokalisationssequenz aus c-myc eingefügt.

Hierzu wurde das *tetR*-Gen mittels PCR mit den Oligonukleotiden Fwd_TetR+c-myc NLS und Rev_TetR+SG+Agel amplifiziert. Durch das Oligonukleotid Fwd_TetR+c-myc NLS wurde die NLS von c-myc am N-Terminus von TetR eingeführt. Durch das Oligonukleotid Rev_TetR+SG4+Agel wurde ein Ser-Gly₄-Linker c-terminal an TetR sowie eine Agel-Schnittstelle eingeführt.

Für das Fusionsprotein aus TetR und hnRNP A1 wurde mit den Oligonukleotiden Fwd_hnRNPA1 (UH TetR) und Rev_hnRNPA1 + Agel eine PCR über genomische DNA aus humanen Zellen durchgeführt. Für das Fusionsprotein mit ASF wurde die Sequenz von ASF aus den vier Oligonukleotiden Fragment 1_ASF, Fragment 2_ASF, Fragment 3_rev ASF und

Ergebnisse

Fragment 4_rev ASF assembliert. Hierzu wurden die Oligonukleotiden in einer PCR mit den Oligonukleotiden Fwd_ASF (UH TetR) und Rev_ASF + Agel zusammengefügt und amplifiziert. Da die ASF- bzw. hnRNP A1-Fragmente um 21 nt mit dem TetR-Fragment überlappen, wurden die Fragmente in einer *overlap* PCR ohne Matrize mit den Oligonukleotiden Fwd_TetR+c-myc NLS und Rev_ASF + Agel bzw. Rev_hnRNPA1 + Agel zusammengeführt. Die PCR-Produkte und der Vektor pWHE211_TetR-CTCF wurden mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Agel geschnitten und ligiert. *E. coli* DH5 α wurde mit dem Ligationsansatz transformiert. Die Insertion von TetR in der gewünschten Orientierung sowie der Ausschluss von Sekundärmutationen wurde mittels Sequenzierung mit dem Oligonukleotid Seq_pWHE211 in CMV bestätigt. Der Vektor pWHE211-c-myc-NLS-TetR ist in Abbildung 4-30 dargestellt. Stellvertretend für die für Fusionsproteine codierenden Vektoren ist pWHE211_c-myc NLS TetR-hnRNPA1 in Abbildung 4-31 dargestellt.

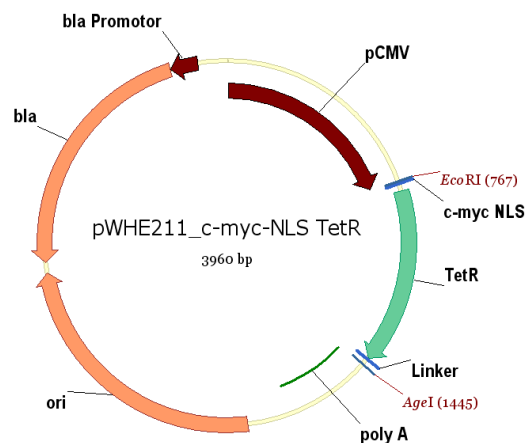


Abbildung 4-30: Vektorkarte für p_WHE211_c-myc-NLS TetR.

Das *tetR*-Gen ist unter der Kontrolle eines CMV-Promotors und enthält eine Kernlokalisationssequenz (c-myc NLS). Die β -Lactamase (bla) bewirkt die Ampicillinresistenz. Gene und funktionale Elemente sind als Pfeile dargestellt.

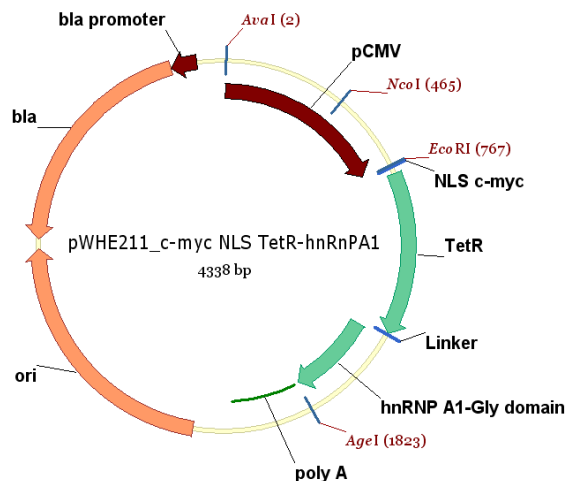


Abbildung 4-31: Vektorkarte für pWHE211_c-myc NLS TetR- hnRNPA1.

Das TetR-Fusionsprotein TetR-hnRNPA1 ist unter der Kontrolle eines CMV-Promotors und enthält eine Kernlokalisationssequenz (c-myc NLS). Die β -Lactamase (bla) bewirkt die Ampicillinresistenz. Gene und funktionale Elemente sind als Pfeile dargestellt.

4.3.1.2 Klonierung des Auffüllplasmids pWHE211-CMV

Bei der Transfektion in humane Zellen wird durch die Transfektion von größeren DNA-Mengen eine höhere Transfektionseffizienz erreicht. Der Transfektionsansatz wird deshalb mit einem sogenannten Auffüllplasmid auf die gewünschte DNA-Menge erhöht. Um mögliche Wechselwirkungen zwischen den transfizierten Plasmiden oder Effekte des Auffüllplasmids auf die Zelle auszuschließen, sollte in dem für TetR codierenden Vektor pWHE211_TetR-CTCF (Abbildung 4-29) der CMV-Promotor deletiert werden. Damit besitzt der Auffüllvektor das gleiche Plasmidrückgrad wie der transfizierte Vektor pWHE211, es findet jedoch keine zusätzliche Proteinexpression statt.

Der Vektor pWHE211-TetR-CTCF wurde mit XhoI und XbaI geschnitten und die Überhänge der Restriktion mit dem *blunting enzyme* aus dem Clone JET Kit von Thermo Scientific entfernt. Der Vektor wurde ligiert und *E. coli* DH5α damit transformiert. Die Deletion wurde mittels Sequenzierung mit dem Oligonukleotid Seq_pWHE211 in CMV bestätigt. Das entstandene Plasmid pWHE211ΔCMV, welches im Folgenden als Auffüllplasmid verwendet wurde, ist in Abbildung 4-32 dargestellt.

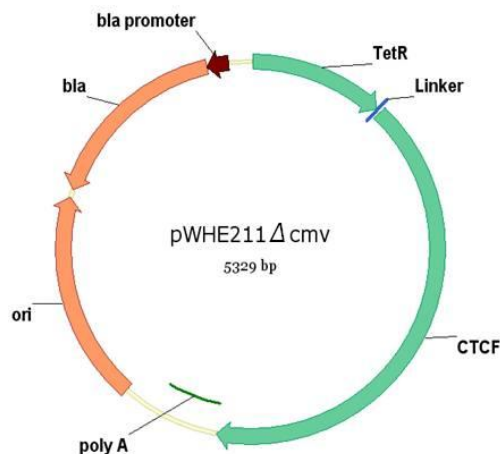


Abbildung 4-32: Vektorkarte für das Auffüllplasmid pWHE211ΔCMV.
Hier wurde der CMV-Promotor entfernt, weshalb das Fusionsprotein TetR-CTCF ohne Promotor vorliegt. Die β-Lactamase (bla) bewirkt die Ampicillinresistenz. Gene und funktionale Elemente sind als Pfeile dargestellt.

4.3.2 Analyse der TetR Expression mittels Western Blot

HeLa-Zellen wurden mit dem Vektor pWHE211_c-myc NLS TetR-hnRNPA1 und dem Auffüllplasmid pWHE211ΔCMV transfiziert. 24 h später wurde der Proteinextrakt der Zellen präpariert und TetR mittels Western Blot analysiert. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Der Blot ist in Abbildung 4-33 dargestellt.

Ergebnisse

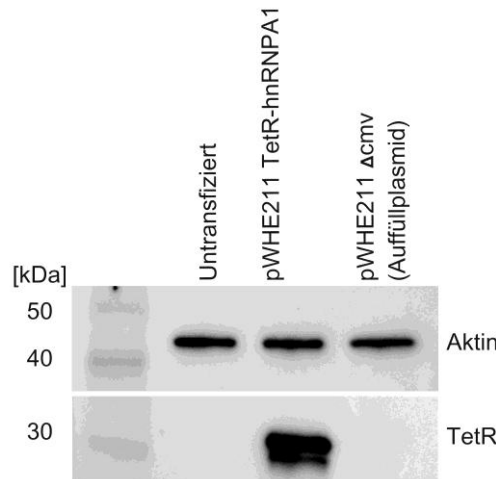


Abbildung 4-33: Western Blot für TetR.

Es wurden untransfizierte Zellen (Untransfiziert), das Fusionsprotein TetR-hnRNP A1 exprimierenden Zellen (pWHE 211 TetR-hnRNPA1) und Zellen, welche mit dem Auffüllplasmid ohne CMV-Promotor (pWHE211 Δ cmv) transfiziert wurden, untersucht. Als Ladekontrolle wurde Aktin verwendet. Der Blot wurde einmal durchgeführt.

Der Blot zeigt untransfizierte Zellen verglichen mit Zellen, welche mit dem Vektor pWHE211 TetR-hnRNPA1 transfiziert wurden. Das Fusionsprotein TetR-hnRNP A1 hat ein Molekulargewicht von 35,9 kDa. Es war eine deutliche Bande bei ca. 35 kDa für TetR detektierbar (Abbildung 4-33). Die Doppelbande wurde möglicherweise durch partiellen Verlust der hnRNP A1-Domäne hervorgerufen.

Des Weiteren wurden Zellen mit dem Auffüllplasmid pWHE211 Δ CMV transfiziert. Hier zeigte sich keine Bande für TetR.

4.3.3 Regulation des alternativen Spleißens des pMA-Minigens mit dem TetR bindenden Aptamer

Für die ersten Versuche wurde das pMA-Minigen von Zhand und Chasin¹²⁵ verwendet. Der Vorteil eines Minigens besteht darin, dass keine Spleißenhancer oder -silencer vorhanden sind und das System sehr übersichtlich ist. Das hier verwendete pMA-Minigen besteht aus zwei Exons und Introns aus dem Hamster *dhfr*-Gen, welches für die Dihydrofolatreduktase codiert. Zwischen den zwei Exons befindet sich ein synthetisches Kassettenexon aus CAA-Wiederholungen mit der 3'-Spleißstelle aus dem Intron 3 des *dhfr*-Gens und der 5'-Spleißstelle aus Intron 1. Das Minigen ist schematisch in Abbildung 4-34 gezeigt.



Abbildung 4-34: Schematische Darstellung des Minigens.

Es wurden verschiedene 3'-Spleißstellen am Kassettenexon genutzt.

Es wurden drei verschiedenen 3'-Spleißstellen im Intron 1 verwendet, die ein unterschiedlich starke Inklusionsraten haben. Das Konstrukt mit dem höchsten Inklusionslevel von 70% heißt „i6u555“ und verfügt über keinerlei *enhancer*.¹²⁵ Das Konstrukt „i4u555“ hat eine Inklusionsrate von 40% und enthält ebenfalls keinerlei *enhancer*.¹²⁵ Das letzte Konstrukt „i255“ verfügt über einen *enhancer* innerhalb des Kassettenexons und weist eine Inklusionsrate von 25% auf.¹²⁵

4.3.3.1 Klonierung der pMA-Minigenvektoren

Als Ausgangsvektor für das pMA Minigen wurde der Vektor pMA_CMV_i6u555 Tc2 genutzt. Dieser codiert für das pMA-i6u555-Minigen unter einem CMV-Promotor. Das Tetrazyklin bindende Aptamer (Tc Aptamer) liegt hier direkt *downstream* der 5'-Spleißstelle im Intron 2. Der Vektor verfügt über eine Ampicillinresistenz und ist in Abbildung 4-35 dargestellt.

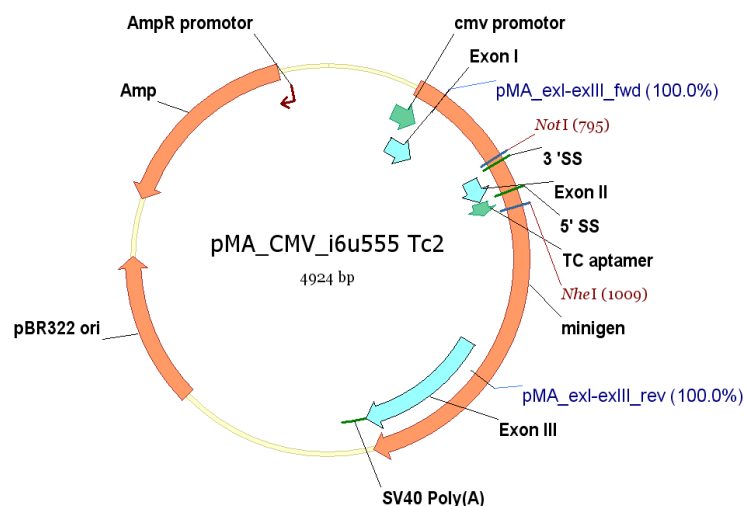


Abbildung 4-35: Ausgangsvektor pMA_CMV_i6u555 Tc2.

Der Vektor codiert für das pMA-Minigen i6u555, welches aus drei Exons (türkise Pfeile) und zwei Introns besteht, unter einem CMV-Promotor. Das Tetrazyklin bindende Aptamer (Tc Aptamer) liegt hier direkt 3' der 5'-Spleißstelle (SS) im Intron 2. Des Weiteren verfügt er über eine Ampicillinresistenz. Gene sind als orange Pfeile dargestellt und funktionale Elemente als grüne Pfeile. Die Bindestellen der für die Spleißmusteranalyse eingesetzten Primer pMA_exl-exIII_fwd und _rev sind in blau dargestellt.

Zusätzlich zu dem in pMA_CMV_i6u555 Tc2 vorhandenen Exon 2 wurde das Exon 2 aus den Vektoren pMA_CMV i255 bzw. i4u555 entnommen. Die Vektoren wurde mit den Restriktionsenzymen NotI und NheI geschnitten die Inserts aus i225 bzw. i4u555 wurden mit dem Vektorrückgrat von pMA_CMV_i6u555 Tc2 ligiert und *E. coli* DH5α mit dem Ansatz transformiert. Die Insertion des Exon 2 in der gewünschten Orientierung sowie der Ausschluss von Sekundärmutationen wurde mittels Sequenzierung mit dem Oligonukleotid pMA_klon_fwd bestätigt. Der erhaltene Vektor pMA_CMV_i6u555 ist in Abbildung 4-36 dargestellt.

Ergebnisse

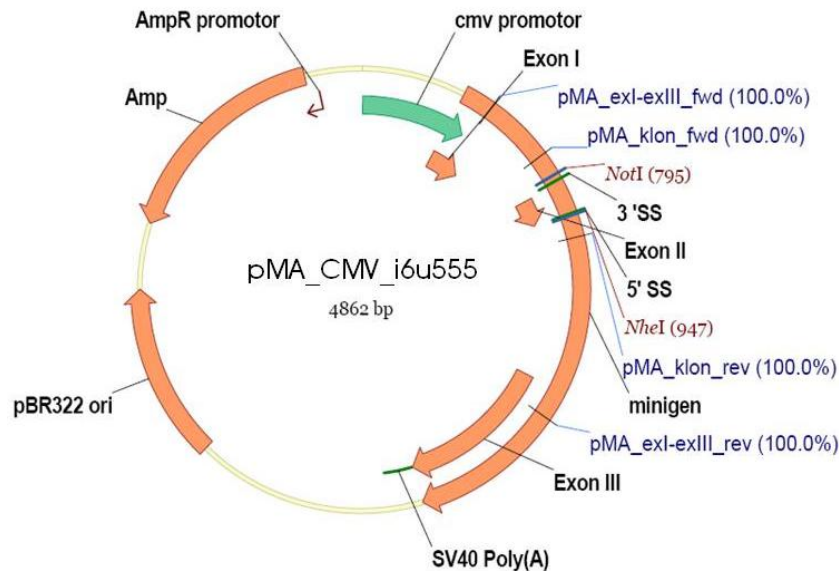


Abbildung 4-36: Vektorkarte für pMA_CMV_i6u555.

Der Vektor codiert für das pMA-Minigen i6u555, welches aus drei Exons (orangene Pfeile) und zwei Introns besteht, unter einem CMV-Promotor. Des Weiteren verfügt er über eine Ampicillinresistenz. Die Oligonukleotide pMA_klon_fwd bzw. pMA_klon_rev binden innerhalb von Intron 1 bzw. 2 und die Oligonukleotide zur Analyse des Spleißmusters pMA_exl-exIII_fwd bzw. pMA_exl-exIII_rev binden innerhalb von Exon 1 bzw. 3, während die Klonierungsoligonukleotide pMA_klon_fwd und -rev innerhalb des Introns 2 bzw. 3 binden. Gene und funktionale Elemente sind als Pfeile dargestellt

4.3.3.2 TetR Aptamer-Konstrukte für das pMA-Minigen

Für die Konstrukte zur Regulation des alternativen Spleißens wurde das TetR bindende Aptamer 12_1R⁴⁴ verwendet. Dieses wurde direkt *downstream* der 5'-Spleißstelle des Introns 2 inseriert. Die Konstrukte sind schematisch in Abbildung 4-37 gezeigt und werden in Abbildung 4-38 ausführlich dargestellt.

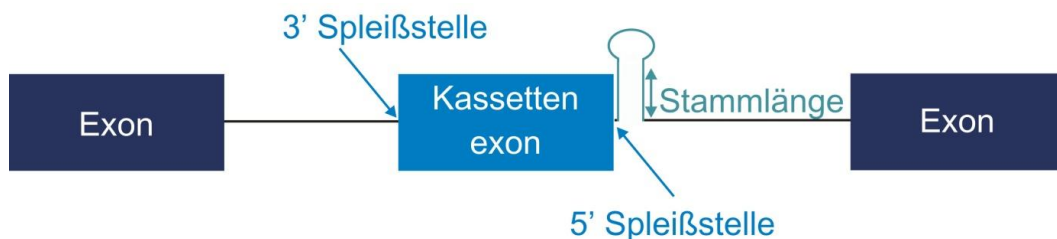


Abbildung 4-37: Schematische Darstellung der Variationen in den Konstrukten.

Zur Optimierung des Effekts wurden verschiedene 3'- und 5'-Spleißstellen am Kassettenexon getestet und die Stammlänge des Aptamers variiert.

Ergebnisse

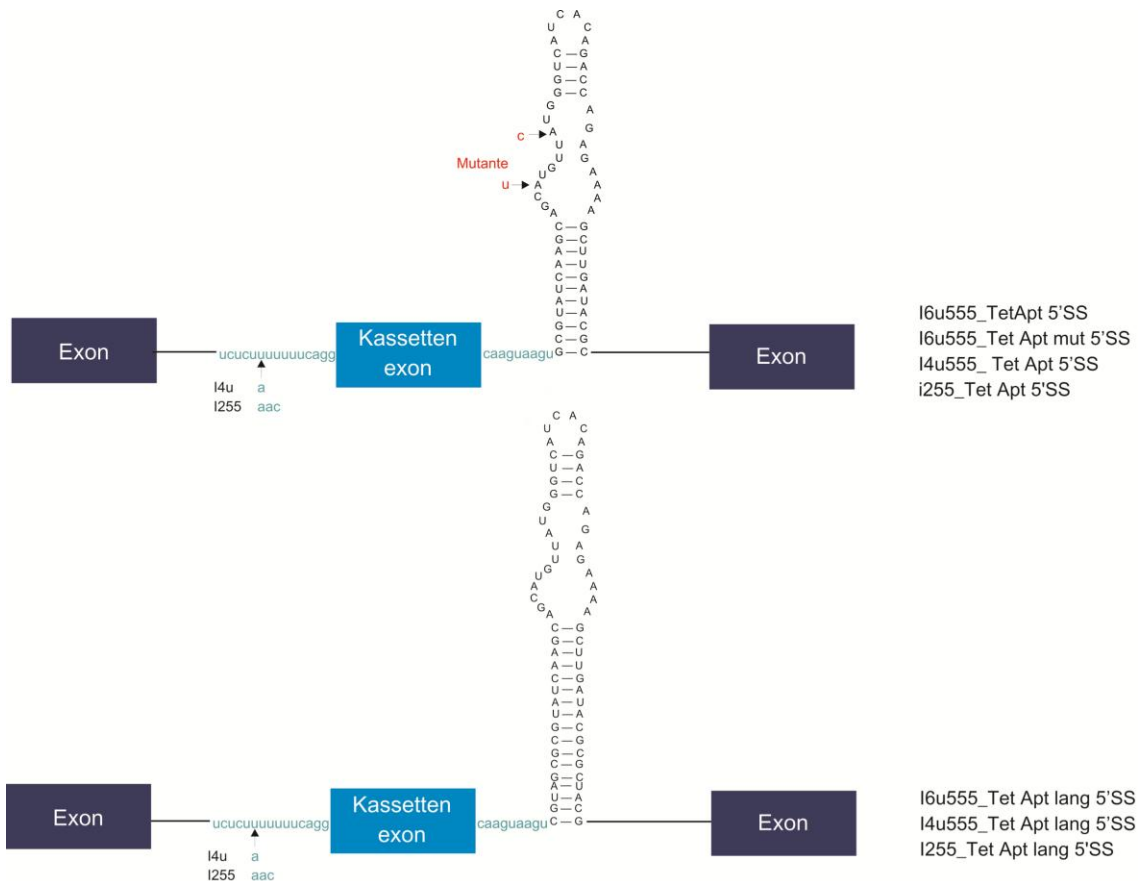


Abbildung 4-38: Schematische Darstellung der getesteten Konstrukte im pMA Minigen¹²⁵ Kontext. Ausgangskonstrukt war das TetR bindende Aptamer 12_1R (TetR Apt) im i6u555 und i4u555 Kontext (i6u555 TetR Apt 5' SS und i4u555 TetR Apt 5' SS). Alle Aptamere wurden direkt hinter der 5'-Spleißstelle im Intron 2 inseriert. Die beiden Minigene i6u555 und i4u555 unterscheiden sich in der 3'-Spleißstelle (türkis) im Intron 1. Zur Kontrolle wurden in das Konstrukt i6u555 TetR Apt 5' SS zwei Punktmutationen (rot) eingeführt. Sie verhindern die Bindung von TetR an das Aptamer (i6u555 TetR Apt mut 5'SS). Des Weiteren wurde der Stamm des TetR bindenden Aptamers um 6 bp verlängert (i6u555_TetR Apt lang 5'SS und i4u555 TetR Apt lang 5' SS).

Das Aptamer wurde direkt *downstream* der 5'-Spleißstelle inseriert. Die Konstrukte wurden entsprechend den verwendeten Spleißstellen „i6u555“, „i4u555“ bzw. „i255“ mit „i6u555_TetR Apt 5'SS“, „i4u555_TetR Apt 5' SS“, „i255_TetR Apt 5' SS“ benannt. Weiterhin wurde die Länge der Aptamerstämme variiert. Durch die Anpassung der Stammlänge kann die Stabilität des Aptamers verändert werden und damit auch die Zugänglichkeit der 5'-Spleißstelle. Dies war von früheren Experimenten in Hefe bekannt.⁶³ Hierzu wurde bei allen Konstrukten der 11 bp lange Stamm des TetR bindenden Aptamers 12_1R um 6 bp verlängert („i6u555_TetR Apt lang 5' SS“, „i4u555_TetR Apt lang 5' SS“ und „i255 TetR Apt lang 5' SS“).

Zur Kontrolle des Regulationseffektes wurden zwei Punktmutationen in das TetR bindende Aptamer 12_1R im Bindebereich von TetR eingeführt, wodurch die Bindung an TetR verhindert wird („i6u555_TetR Apt mut 5' SS“).

Zum besseren Überblick sind die in dieser Arbeit zur Spleißregulation verwendeten Spleißstellen in Tabelle 4-2 aufgeführt.

Tabelle 4-2: Überblick über die im Rahmen der Spleißregulation verwendeten Spleißstellen (SS).

Name	Spleißstelle	Inklusionslevel	Sequenz
„i6u555“	3'-SS	70% ¹²⁵	cttttttcagg
„i4u555“	3'-SS	40% ¹²⁵	atttttcagg
„i255“	3'-SS	25% ¹²⁵	aactttcagg
pMA 5' SS	5'-SS von pMA-Minigen	ca. 60%	caaguaagu
starke Spleißstelle	5'-SS	80% ¹²⁶	gaggugagu
IGF2BP1 SS	5'-SS von GFP-Minigen	ca. 30%	agggugagg

4.3.3.2.1 Klonierung von pMA_ TetR Apt 5'SS

Für die Insertion des TetR bindenden Aptamers direkt *downstream* der 5'-Spleißstellen der Minigene pMA_CMV i4u555, pMA_CMV i6u555 und pMA_CMV i255 wurde mit den Oligonukleotiden pMA_klon_fwd und Rev_ExonII 5'SS (UH TetApt) eine PCR mit den Vektoren pMA_CMV i6u555 tc2, pMA_CMV i4u555 und pMA_CMV i255 als Matrize durchgeführt, wobei ein Teil des Konstrukts amplifiziert wurde. Um das TetR bindende Aptamer des Konstrukts zu vervollständigen, wurde mit den Oligonukleotiden pMA_klon_fwd und Rev_TetR Apt + NheI eine PCR mit dem ersten PCR-Fragment als Matrize durchgeführt. Hierbei bindet das Oligonukleotid Rev_TetR Apt + NheI am 3'-Ende des ersten PCR Fragments und führt eine NheI-Schnittstelle ein. Die PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsenzymen NheI und NotI geschnitten.

Für die Verlängerung des Stammes des TetR bindenden Aptamers um 6 bp wurde das Aptamer in einer PCR mit den beiden um 20 nt überlappenden Oligonukleotiden Fwd_TetR Apt + NheI und Rev_ TetR Apt + NheI hergestellt und das Produkt mit NheI geschnitten.

Der Vektor pMA_CMV i6u555 tc2 wurde mit NheI und NotI bzw. für das lange TetR Konstrukt nur mit NheI geschnitten und dephosphoryliert. Die geschnittenen Vektoren wurden mit den geschnittenen PCR-Produkten ligiert und *E. coli* DH5α damit transformiert. Die Insertion des Aptamers in der gewünschten Orientierung sowie der Ausschluss von Sekundärmutationen wurde mittels Sequenzierung mit dem Oligonukleotid pMA_klon_fwd bestätigt. Stellvertretend für die erhaltenen Vektoren ist in Abbildung 4-39 pMA_CMV_i6u555 TetR Apt 5'SS dargestellt.

Ergebnisse

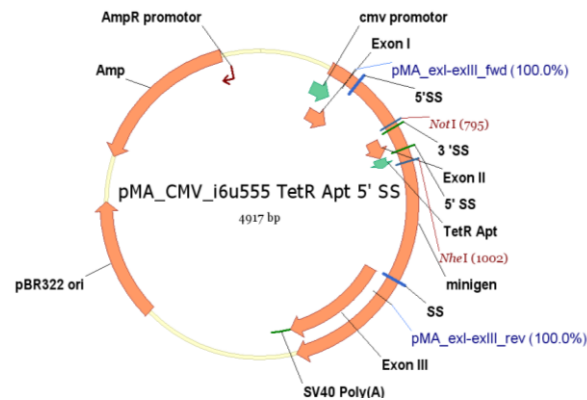


Abbildung 4-39: Vektorkarte pMA_CMV_i6u555 TetR Apt 5' SS.

Der Vektor codiert für das pMA-Minigen i6u555, welches aus drei Exons und zwei Introns besteht, unter einem CMV-Promotor. Das TetR bindende Aptamer (TetR Apt) liegt direkt *downstream* der 5'-Spleißstelle (SS) im Intron 2. Des Weiteren verfügt er über eine Ampicillinresistenz. Die Bindestellen der Oligonukleotide, welche für die PCR zur Analyse des Spleißmusters verwendet wurden, sind in blau eingezeichnet (pMA_exl-exIII_fwd bzw. _rev). Gene und funktionale Elemente sind als Pfeile dargestellt

4.3.3.2.2 Klonierung von pMA_CMV_i6u555 TetR Apt mut 5' SS

Als Ausgangsvektor diente der in Kap. 4.3.3.1 klonierte Vektor pMA_CMV_i6u555.

Mit dem Oligonukleotiden pMA_klon_fwd und Rev_pMA ExII (UH Tet Apt mut) und mit den Oligonukleotiden fwd_pMA Tet Apt mut (UH ExII) und pMA_klon_rev mit der Matrize pMA_CMV_i6u555 TetR Apt 5' SS wurde eine PCR durchgeführt. Die Fragmente wurden in einer *overlap* PCR zusammengeführt. Das PCR-Produkt und der Vektor pMA_CMV_i6u555 TetR Apt 5' SS wurden mit NheI und NotI geschnitten und ligiert. *E. coli* DH5α wurde mit dem Ligationsansatz transformiert. Die Insertion des Aptamers sowie der Ausschluss von Sekundärmutationen wurde mittels Sequenzierung mit dem Oligonukleotid pMA_klon_fwd bestätigt. In Abbildung 4-40 ist der erhaltende Vektor pMA_CMV_i6u555 TetR Apt mut 5' SS dargestellt.

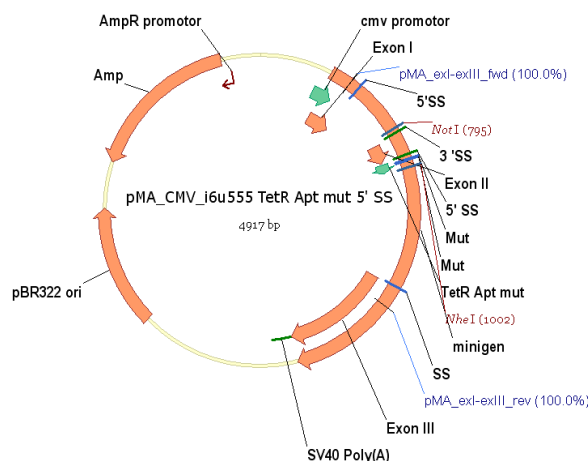


Abbildung 4-40: Vektorkarte für pMA_CMV_i6u555 TetR Apt mut 5' SS.

Der Vektor codiert für das pMA-Minigen i6u555, welches aus drei Exons und zwei Introns besteht, unter einem CMV-Promotor und verfügt über eine Ampicillinresistenz. Das mutierte TetR bindende Aptamer (TetR Apt mut), welches zwei Punktmutationen aufweist (Mut) liegt *downstream* der 5'-Spleißstelle (SS) im Intron 2. Die Bindestellen der Oligonukleotide für die PCR zur Analyse des Spleißmusters sind in blau eingezeichnet (pMA_exl-exIII_fwd bzw. _rev). Gene und funktionale Elemente sind als Pfeile dargestellt.

4.3.3.2.3 Analyse des Spleißmusters der pMA-Konstrukte

HeLa-Zellen wurden mit den Minigenkonstrukten mit und ohne Aptamer transfiziert, die RNA der Zellen 24 h nach der Transfektion präpariert, in cDNA umgeschrieben und das Spleißmuster in einer PCR mit den Oligonukleotiden pMA_exl-exIII_fwd und pMA_exl-exIII_rev untersucht. Das Oligonukleotid pMA_exl-exIII_fwd bindet im Exon 1, während das Oligonukleotid pMA_exl-exIII_rev im Exon 3 bindet. Als Kontrolle für die PCR wurde das Minigen mit dem Tetrazyklin bindenden Aptamer direkt *downstream* der 5'-Spleißstelle mitgeführt. Das resultierende Gel ist in Abbildung 4-41 dargestellt. Da die Gele zusätzliche unspezifische Banden zeigten, sind sie nicht quantifizierbar. Die Inklusionsraten wurden deshalb aus den Gelbildern nur abgeschätzt.

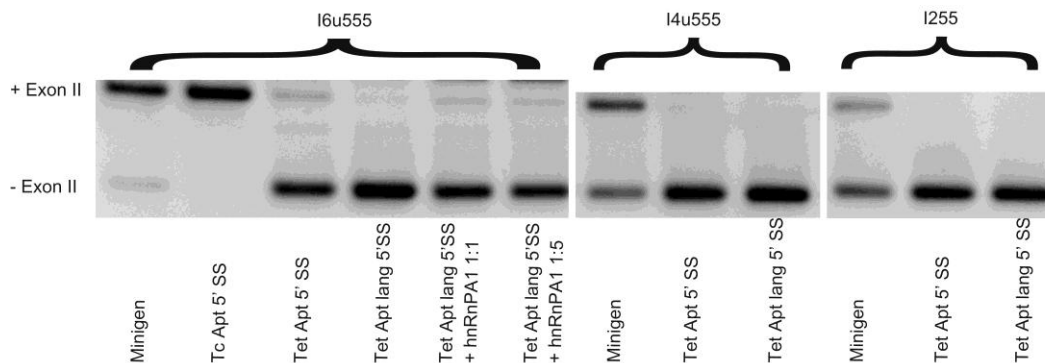


Abbildung 4-41: Gel zur Analyse des Spleißmusters (3% Agarose) bei Insertion des TetR bindenden Aptamers.

Es wurden die 3'-Spleißstellen „i6u555“, „i4u555“ und „i255“ getestet. Aufgetragen sind jeweils das Minigen ohne Aptamer (Minigen) und die Konstrukte mit Aptamer mit 7 und 11 bp langem Stamm (Tet Apt 5' SS und Tet Apt lang 5' SS). Zur Kontrolle wurde das Tetrazyklin bindende Aptamer hinter der 5'-Spleißstelle getestet (Tc Apt 5' SS). Mit dem Konstrukt „i6u555“ Tet Apt lang 5' SS wurde zusätzlich der das Fusionsprotein TetR-hnRNPA1 exprimierende Vektor 1:1 bzw. in 5-fachem Überschuss zu dem Aptamervektor kotransfiziert (Tet Apt lang 5' SS + hnRNPA1 1:1 bzw. Tet Apt lang 5' SS + hnRNPA1 1:5). Es wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt.

Aus Abbildung 4-41 ist ersichtlich, dass das Minigen „i6u555“ ohne Aptamer eine Inklusionsrate von ca. 80% hat, da die Bande mit Exon 2 bei ca. 300 bp wesentlich stärker ist als die ohne Exon 2 bei ca. 190 bp. Wurde das Tetrazyklin bindende Aptamer (Tc Apt) inseriert, verschob sich das Spleißmuster zu ca. 90% Inklusion von Exon 2. Wurde dagegen das TetR bindende Aptamer an der gleichen Stelle direkt *downstream* der 5'-Spleißstelle („i6u555_Tet Apt 5' SS“) inseriert, verschob sich das Spleißmuster zu ca. 70% Exklusion. Bei Insertion des Aptamers mit einem 17 bp langen Stamm („i6u555 Tet Apt lang 5' SS“) verschob sich das Spleißmuster sogar zu 100% Exklusion. Bei den Proben, bei denen zusätzlich der Vektor transfiziert wurde, welcher das Fusionsprotein TetR-hnRNPA1 exprimiert, erschien wieder eine schwache Exklusionsbande bei ca. 300 bp.

Für das Minigen „i4u555“ waren ähnliche Effekte zu beobachten. Das Minigen ohne Aptamer zeigte ein Inklusionslevel von ca. 60%. Wurde das TetR bindende Aptamer mit einem 11 oder 17 bp langen Stamm hinter der 5'-Spleißstelle im Intron 2 inseriert, verschob sich das Spleißmuster und es war keine Inklusionsbande mehr sichtbar.

Ergebnisse

Bei dem Minigen „i255“ lag das Inklusionslevel bei ca. 30%. Auch hier waren keine Inklusionsbanden bei ca. 300 bp mehr sichtbar, wenn das Aptamer oder die lange Variante des Aptamers direkt *downstream* der 5'-Spleißstelle im Intron 2 inseriert wurden.

Durch die zusätzliche Expression von TetR soll die Inklusion inhibiert werden, indem die Spleißstelle durch das gebundene Protein nicht mehr zugänglich ist. Deshalb sollte mit einem Minigen weitergearbeitet werden, welches überhaupt noch Inklusion von Exon 2 zeigt. Da nur bei dem Minigen „i6u555“ nach Insertion des Aptamers („i6u555 TetR Apt 5' SS“) eine Inklusionsbande beobachtet werden konnte, wurde mit diesem Minigen weitergearbeitet.

4.3.3.2.4 Regulation des Spleißens durch das Konstrukt „i6u555 TetR Apt 5' SS“

Das Minigen „i6u555“ mit dem TetR bindenden Aptamer (11 bp Stamm) wurde mit unterschiedlichen Mengen des TetR exprimierenden Vektors pWHE211_c-myc NLS-TetR in HeLa-Zellen kotransfiziert und die Zellen in An- und Abwesenheit von 5 µg/ml Doxycyclin inkubiert. Das Spleißmuster wurde wie in Kap. 4.3.3.2.3 beschrieben untersucht. Ein exemplarisches Gel zur Analyse des Spleißmusters ist in Abbildung 4-42 gezeigt.

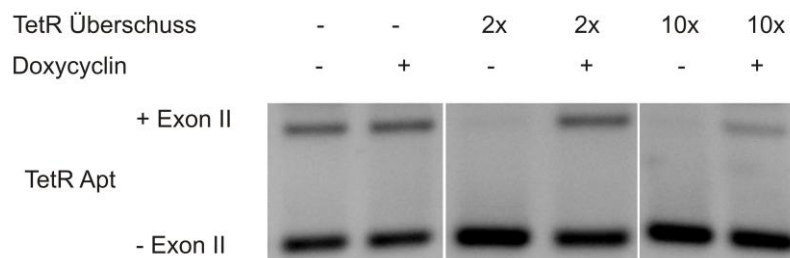


Abbildung 4-42: Exemplarisches Gel zur Analyse des Spleißmusters (3% Agarose) für pMA_i6u555 TetR Apt 5' SS mit unterschiedlich hohem Überschuss an TetR exprimierendem Plasmid. Von links nach rechts ist gezeigt: das Minigen mit TetR bindendem Aptamer (TetR Apt) ohne Kotransfektion mit dem TetR exprimierendem Vektor, das Minigen mit TetR bindendem Aptamer mit zweifachem Überschuss an TetR exprimierendem Plasmid (2x) und das Minigen mit TetR bindendem Aptamer mit 10-fachem Überschuss an TetR exprimierendem Plasmid (10x) in Ab- (-) und Anwesenheit (+) von 5 µg/ml Doxycyclin. Die Transfektion wurde mindestens einmal reproduziert.

Abbildung 4-42 zeigt, dass das Minigen „i6u555_TetR Apt 5' SS“ eine Inklusionsrate von ca. 30% aufwies und die Spleißreaktion nicht von Doxycyclin beeinflusst wurde. Wurde nun TetR exprimiert, war keine Inklusionsbande mehr detektierbar. In Anwesenheit von Doxycyclin wurde die Inklusionsbande wieder sichtbar und das Inklusionslevel lag erneut bei ca. 30%. Wurde das TetR exprimierende Plasmid in 10-fachem Überschuss zum Minigenplasmid zugegeben, war der gleiche Effekt beobachtbar. In Abwesenheit von Doxycyclin fand keine Inklusion des Exons 2 statt, während in Anwesenheit von Doxycyclin eine Inklusionsbande sichtbar war. Diese ist jedoch schwächer, als die ursprüngliche Inklusionsbande in Abwesenheit von TetR. Der durch TetR-Zugabe hervorgerufene Effekt konnte demnach durch die Transfektion von einer größeren Plasmidmenge nicht verstärkt werden, weshalb im

Folgenden immer die doppelte Menge an TetR exprimierendem Plasmid bezogen auf das Minigenplasmid transfiziert wurde.

4.3.3.2.5 Analyse des Einflusses von unterschiedlich großen TetR Varianten auf das Spleißmuster

Der Effekt der Spleißregulation basiert auf einer sterischen Blockade der 5'-Spleißstelle durch TetR. Deshalb wurde getestet, ob der Effekt mit TetR-Fusionsproteinen, die ein größeres Molekulargewicht haben, verstärkt werden kann. Hierzu wurden erneut HeLa-Zellen mit dem Minigen „i6u555_TetR Apt 5' SS“ und TetR exprimierenden Vektoren transfiziert und in An- und Abwesenheit von 5 µg/ml Doxycyclin inkubiert. Das Spleißmuster wurde wie in Kap. 4.3.3.2.3 beschrieben untersucht. Das Gel zur Analyse des Spleißmusters ist in Abbildung 4-43 dargestellt.

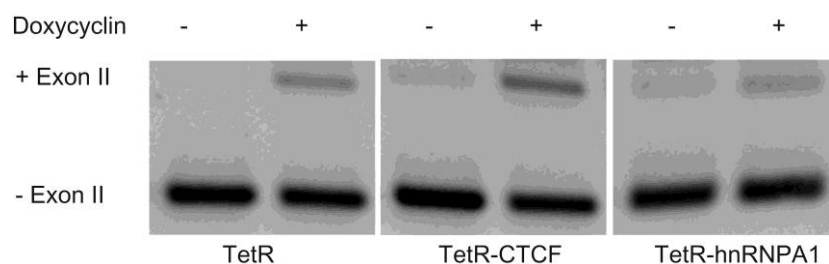


Abbildung 4-43: Exemplarisches Gel zur Analyse des Spleißmusters (3% Agarose) von „i6u555 TetR Apt 5' SS“ kotransfiziert mit unterschiedlich großen TetR-Varianten.

Von links nach rechts wurden die HeLa-Zellen mit pWHE211_c-myc NLS-TetR (23,8 kDa) in Ab- (-) und Anwesenheit (+) von 5 µg/ml Doxycyclin, mit pWHE211_c-myc NLS-TetR-CTCF (106,6 kDa) in Ab- (-) und Anwesenheit (+) von 5 µg/ml Doxycyclin und mit pWHE211_c-myc-NLS-TetR-hnRNPA1 (35,9 kDa) in Ab- (-) und Anwesenheit (+) von 5 µg/ml Doxycyclin kotransfiziert. Die Transfektion wurde mindestens einmal reproduziert

Das Gel zur Analyse des Spleißmusters in Abbildung 4-43 zeigt das Spleißverhalten des „i6u555_TetR Apt 5' SS“-Konstrukts in Anwesenheit von unterschiedlichen TetR-Varianten. Die Anwesenheit von TetR, welches zusammen mit dem Linker 213 Aminosäuren umfasst und als Monomer ein Molekulargewicht (MW) von 23,8 kDa aufweist, zeigte den bereits in Abbildung 4-42 beobachteten Effekt. Des Weiteren wurde der Effekt des Fusionsproteins TetR-CTCF untersucht (940 Aminosäuren, MW = 106,6 kDa). Auch hier war die Inklusionsbande in Abwesenheit von Doxycyclin schwach erkennbar, während in Anwesenheit von Doxycyclin eine Inklusionsrate von ca. 30% beobachtbar war. Für TetR-hnRNP A1, welches ein 340 Aminosäure langes Fusionsprotein aus TetR mit der *silencer*-Domäne von hnRNP A1 ist (MW = 35,9 kDa), konnte in Abwesenheit von Doxycyclin eine schwache Inklusionsbande beobachtet werden. Diese wurde in Anwesenheit von Doxycyclin stärker. Die Erwartungen, dass die hnRNP A1-Domäne als *silencer* wirkt und das Spleißen inhibiert, erfüllten sich demnach nicht.

Da die Regulationseffekte von TetR und TetR-CTCF vergleichbar waren, wurde mit dem kleineren Protein TetR weiter gearbeitet, um einen eventuellen negativen Einfluss der CTCF-Domäne auszuschließen.

4.3.3.2.6 Analyse des Spleißmusters des Minigens mit dem mutierten TetR bindenden Aptamer

Um nachzuweisen, dass der beobachtete Effekt auf das Spleißen auf eine Wechselwirkung von TetR mit dem Aptamer zurückzuführen ist, wurde eine Mutante untersucht, welche nicht mehr mit TetR wechselwirkt.

HeLa-Zellen wurden mit dem Minigen „i6u555_TetR Apt mut 5' SS“ und dem TetR exprimierenden Vektor transfiziert und mit und ohne 5 µg/ml Doxycyclin inkubiert. Das Spleißmuster wurde wie in Kap. 4.3.3.2.3 beschrieben untersucht. Das Gel zur Analyse des Spleißmusters dieser Mutante ist in Abbildung 4-44 gezeigt.

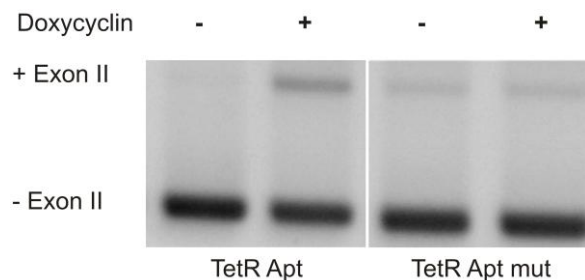


Abbildung 4-44: Exemplarisches Gel zur Analyse des Spleißmusters (3% Agarose) für „i6u555 TetR Apt 5' SS“ (TetR Apt) und „i6u555 TetR Apt mut 5' SS“ (TetR Apt mut).

Gezeigt ist der Zustand in Ab- (-) und Anwesenheit (+) von 5 µg/ml Doxycyclin bei einem zweifachen pWHE211_c-myc NLS-TetR Überschuss während der Transfektion. Die Transfektion wurde mindestens einmal reproduziert.

Die Abbildung zeigt den Effekt der Reduktion der Inklusion von Exon 2 in Abwesenheit von Doxycyclin und der gesteigerten Inklusion in Anwesenheit von Doxycyclin für das Konstrukt „i6u555_TetR Apt 5' SS“. Bei dem mutieren Aptamer war sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Doxycyclin eine schwache Bande für die Inklusion von Exon 2 sichtbar. Doxycyclin hat folglich keinen Effekt auf das Spleißmuster.

4.3.3.3 Optimierung der Spleißregulation im pMA-Minigen durch ein destabilisiertes Aptamer und eine starke Spleißstelle

Die mit dem Konstrukt „i6u555_TetR Apt 5' SS“ erreichte Regulation sollte weiter optimiert werden. Dazu wurde die vorhandene 5'-Spleißstelle im Intron 2 gegen eine starke 5'-Spleißstelle ausgetauscht, um das Level an Inklusion zu erhöhen. In einem weiteren Konstrukt wurde der Stamm des Aptamers gekürzt. Dadurch wird das Aptamer destabilisiert und die 5'-Spleißstelle in Abwesenheit von TetR besser zugänglich, was das Inklusionslevel erhöhen sollte. Die Konstrukte sind in Abbildung 4-45 dargestellt.

Ergebnisse

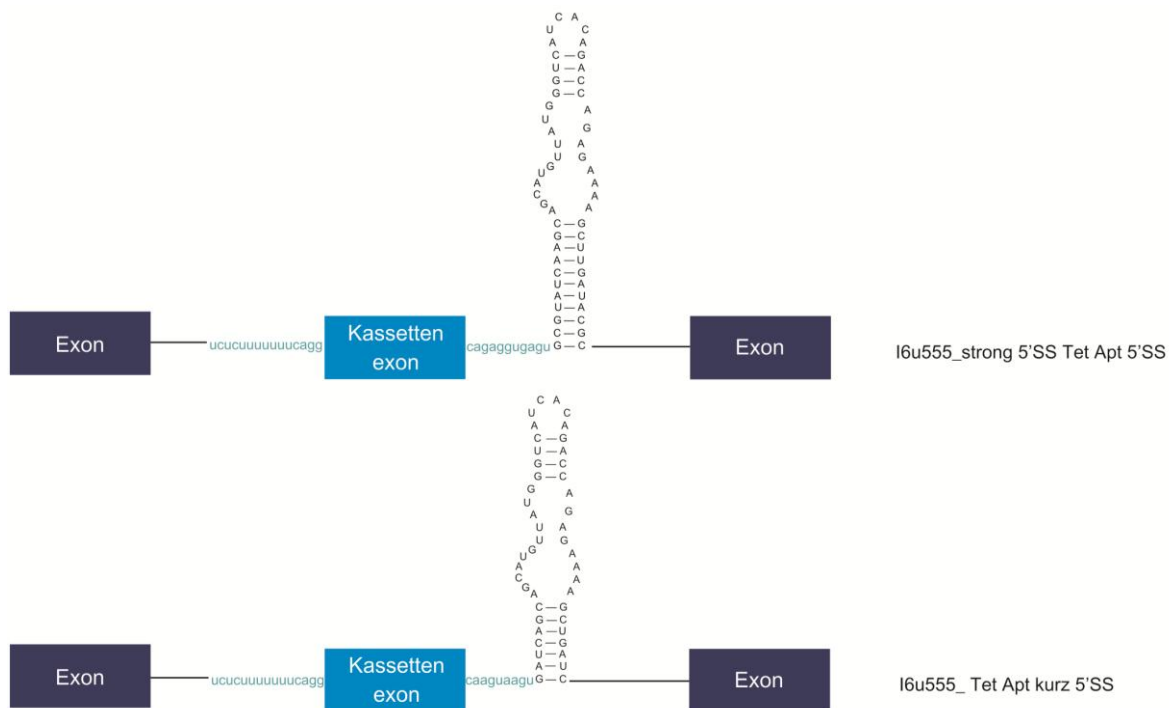


Abbildung 4-45: Schematische Darstellung der neuen Konstrukte im pMA Minigen¹²⁵ Kontext. Ausgangskonstrukt war das TetR bindende Aptamer 12_1R (TetR Apt) im i6u555 (i6u555 TetR Apt 5' SS). Alle Aptamere wurden direkt hinter der 5'-Spleißstelle im Intron 2 inseriert. Es wurde eine starke 5'-Spleißstelle¹²⁶ getestet (i6u555 strong SS TetR Apt 5' SS) und der Stamm des TetR bindenden Aptamers auf 7 bp gekürzt (i6u555_TetR Apt kurz 5' SS).

Da bisher nur bei dem Konstrukt „i6u555_TetR Apt 5'SS“ (Abbildung 4-38) ein Effekt beobachtet werden konnte, wurde dieses Konstrukt für die Optimierung verwendet. Es wurde eine starke 5'-Spleißstelle mit einer Inklusionsrate von 80%¹²⁶ in das Konstrukt i6u555 mit TetR bindendem Aptamer integriert („i6u555_strong SS TetR Apt 5' SS“). Zusätzlich wurde der Aptamerstamm auf 7 bp gekürzt („i6u555_TetR Apt kurz 5' SS“).

4.3.3.3.1 Klonierung der neuen pMA Konstrukte

Zum Kürzen des Aptamerstammes wurde mit den Oligonukleotiden pMA_klon_fwd und Rev_ExonII 5'SS (UH TetApt kurz) eine PCR mit dem Vektor pMA_CMV i6u555 TetR Apt 5'SS als Matrize durchgeführt. Für die Insertion der starken 5'-Spleißstelle wurde mit den Oligonukleotiden pMA_klon_fwd und Rev_ExonII strong 5'SS (UH TetApt) eine PCR mit dem Vektor pMA_CMV i6u555 TetR Apt 5'SS als Matrize durchgeführt. In der ersten PCR wurde nur ein Teil des Aptamers amplifiziert, daher wurde eine weitere PCR zur Vervollständigung der Aptamere durchgeführt. Hierzu wurde mit den Oligonukleotiden pMA_klon_fwd und Rev_TetR Apt kurz + NheI bzw. Rev_TetR Apt + NheI eine PCR mit dem ersten PCR-Fragment als Matrize durchgeführt.

Die PCR-Produkte und der Vektor pMA_CMV i6u555 tc2 wurden mit den Restriktionsenzymen NheI und NotI geschnitten und ligiert. *E. coli* DH5α wurde mit dem Ligationsansatz transformiert. Die Insertion des Aptamers in der gewünschten Orientierung sowie der Ausschluss von Sekundärmutationen wurde mittels Sequenzierung mit dem

Ergebnisse

Oligonukleotid pMA_klon_fwd bestätigt. Stellvertretend für die erhaltenen Vektoren ist in Abbildung 4-46 pMA_CMV_i6u555 str SS TetR Apt 5'SS dargestellt.

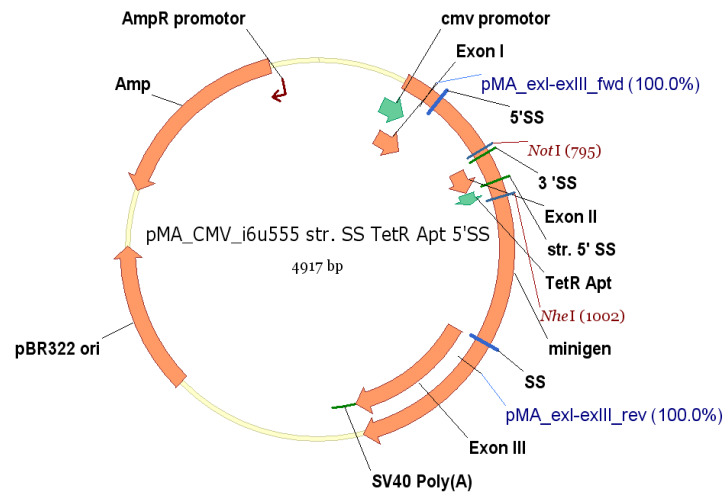


Abbildung 4-46: Vektorkarte für pMA_CMV_i6u555 str SS TetR Apt 5'SS.

Der Vektor codiert für das pMA Minigen i6u555, welches aus drei Exons und zwei Introns besteht, unter einem CMV-Promotor. Das TetR bindende Aptamer (TetR Apt) liegt direkt 3' der starken 5'-Spleißstelle (str. 5' SS) im Intron 2. Des Weiteren verfügt er über eine Ampicillinresistenz. Die Bindestellen der Oligonukleotide, welcher für die PCR zur Analyse des Spleißmusters verwendet wurden sind in blau eingezeichnet (pMA_exl-exIII_fwd bzw. _rev). Gene und funktionale Elemente sind als Pfeile dargestellt.

4.3.3.3.2 Analyse des Spleißmusters der neuen Konstrukte

HeLa-Zellen wurden mit den neuen Konstrukte transfiziert, in An- und Abwesenheit von 5 µg/ml Doxycyclin inkubiert und die RNA der Zellen 24 h nach der Transfektion präpariert, in cDNA umgeschrieben und das Spleißmuster in einer PCR mit den Oligonukleotiden pMA_exl-exIII_fwd und pMA_exl-exIII_rev untersucht. Das Gel zur Analyse des Spleißmusters für das Konstrukt „i6u555_strong SS + TetR Apt 5' SS“ ist in Abbildung 4-47 gezeigt.

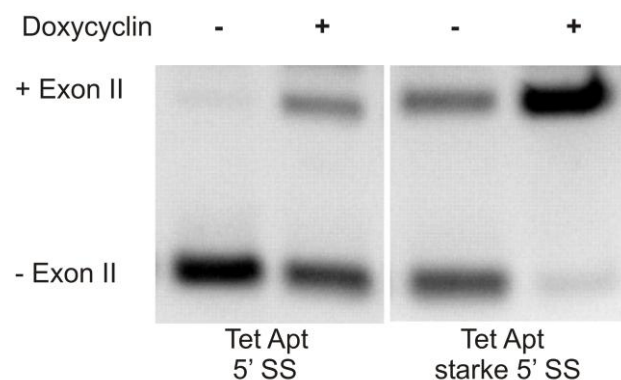


Abbildung 4-47: Exemplarisches Gel zur Analyse des Spleißmusters (3% Agarose) für „i6u555 TetR Apt 5' SS“ (Tet Apt 5'SS) und „i6u555 strong SS + TetR Apt 5' SS“ (Tet Apt starke 5' SS).

Gezeigt ist der Zustand in Ab- (-) und Anwesenheit (+) von 5 µg/ml Doxycyclin bei einem zweifachen pWHE211_c-myc NLS-TetR Überschuss während der Transfektion. Die Transfektion wurde mindestens einmal reproduziert.

Aus Abbildung 4-47 ist ersichtlich, dass das Konstrukt „i6u555_TetR Apt 5' SS“ (Tet Apt 5' SS) in Abwesenheit von Doxycyclin fast keine Inklusion des Exons 2 zeigte, während diese in Anwesenheit von Doxycyclin auf ca. 30% anstieg. In dem Konstrukt „i6u555_strong SS + TetR Apt 5' SS“ (Tet Apt starke SS) lag das Inklusionslevel in Abwesenheit von Doxycyclin bei ca. 40% und stieg in Anwesenheit von Doxycyclin auf ca. 90% an.

Ein exemplarisches Gel zur Analyse des Spleißmusters für das Konstrukt mit dem verkürzten Aptamer ist in Abbildung 4-48 gezeigt.

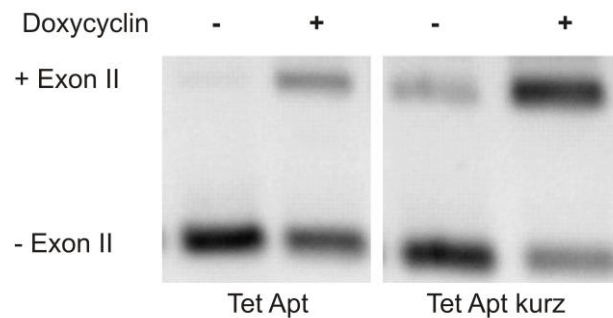


Abbildung 4-48: Exemplarisches Gel zur Analyse des Spleißmusters (3% Agarose) für das Konstrukt „i6u555_TetR Apt kurz 5' SS“ mit dem gekürzten Aptamer (Tet Apt kurz). Gezeigt ist der Zustand in Ab- (-) und Anwesenheit (+) von 5 µg/ml Doxycyclin bei einem zweifachen pWHE211_c-myc NLS-TetR Überschuss während der Transfektion. Zum Vergleich ist auch das Spleißmuster des Konstrukts „i6u555_TetR Apt 5' SS“ (TetR Apt) gezeigt. Die Transfektion wurde mindestens einmal reproduziert.

Das Konstrukt „i6u555_TetR Apt 5' SS“ zeigt in Anwesenheit von Doxycyclin eine Steigerung der Inklusion von Exon 2 auf ca. 30% (Abbildung 4-48). Das destabilisierte Aptamerkonstrukt „i6u555_TetR Apt kurz 5' SS“ hatte in Abwesenheit von Doxycyclin ein Inklusionslevel von ca. 20%, in Anwesenheit von Doxycyclin konnte dieses auf ca. 80% gesteigert werden. Durch die Kürzung des Aptamerstammes konnte demnach das Inklusionslevel erhöht werden.

4.3.3.3 Analyse des Spleißmusters mit revTetR

Für TetR existiert eine reverse Mutante (revTetR), bei welcher ein Austausch von fünf Aminosäuren eine Bindung an die DNA in Anwesenheit von Doxycyclin und ein Ablösen in Abwesenheit von Doxycyclin ermöglicht.⁴³ Es wurde getestet, ob auch revTetR in der Lage ist, das Spleißen des Minigens zu beeinflussen. Hierzu wurde der revTetR exprimierende Vektor in 10-fachem und 19-fachem Überschuss zum Plasmid pMA_i6u555 TetR Apt kurz 5' SS kotransfiziert und die HeLa-Zellen ohne und mit 20 bzw. 50 µM Doxycyclin inkubiert. Nach 24 h wurde die RNA präpariert, in cDNA umgeschrieben und das Spleißmuster in einer PCR mit den Oligonukleotiden pMA_exI-exIII_fwd und pMA_exI-exIII_rev untersucht. Das zugehörige Gel zur Analyse des Spleißmusters ist in Abbildung 4-49 gezeigt.

Ergebnisse

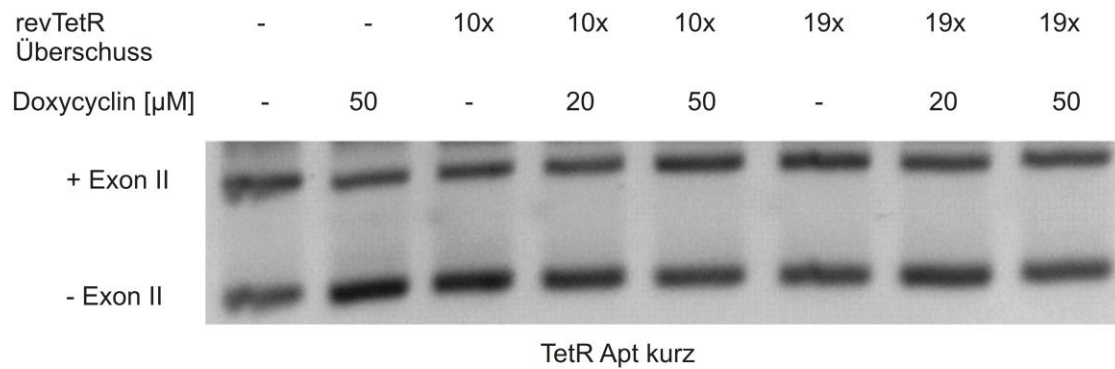


Abbildung 4-49: Exemplarisches Gel zur Analyse des Spleißmusters (3% Agarose) für „i6u555 TetR Apt kurz 5' SS“ mit revTetR.

Gezeigt ist der Zustand in Ab- (-) und Anwesenheit von 20 bzw. 50 μ M Doxycyclin bei einem 10-fachen bzw. 19-fachen pWHE211_c-myc NLS-rev TetR-sM2 Überschuss während der Transfektion. Die Transfektion wurde mindestens einmal reproduziert.

Aus Abbildung 4-49 ist ersichtlich, dass das Inklusionslevel des Minigens „i6u555_TetR Apt kurz 5' SS“ ohne TetR und ohne Doxycyclin bei ca. 60% lag. Wurde nun das reverse TetR-sM2⁴³ exprimiert, veränderten sich die Bandenverhältnis nicht und auch durch die zusätzliche Zugabe von bis zu 50 μ M Doxycyclin bleibt das Inklusionslevel von Exon 2 unbeeinflusst.

4.3.4 Spleißregulation in einem GFP-Minigen

Zur Überprüfung, ob die beobachtete Regulation des alternativen Spleißens spezifisch für das verwendete Minigensystem ist oder universell anwendbar ist, wurde das Aptamer in einem weiteren Minigen getestet. Hierzu wurde ein GFP-Minigen aus der Publikation von Wang *et al.*¹¹⁶ verwendet. Dieses verfügt über drei Exons unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Exon I und III stammen von *gfp*. Als Kassettenexon wurde das Exon 12 mit seinen flankierenden Introns aus dem humanen IGF 2 mRNA-Bindeprotein 1 (IGF2BP1) verwendet. Das Kassettenexon beinhaltet eine Bindestelle für das humanen Pumilio1 Protein (PUF Bindedomäne).

In dieses Minigen wurde das TetR bindende Aptamer inseriert. In Abbildung 4-50 sind die Minigen-Konstrukte schematisch gezeigt, während sie in Abbildung 4-51 ausführlich dargestellt sind.

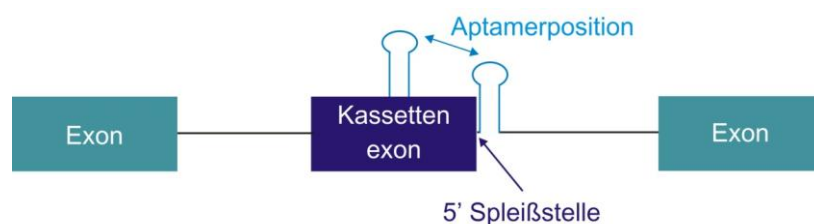


Abbildung 4-50: Schematische Darstellung der Variationen in den GFP-Minigen-Konstrukten.

Zur Optimierung des Effekts wurden verschiedene 5'-Spleißstellen am Kassettenexon getestet und die Position des Aptamers zwischen 3' der 5'-Spleißstelle und innerhalb des Kassettenexons variiert.

Ergebnisse

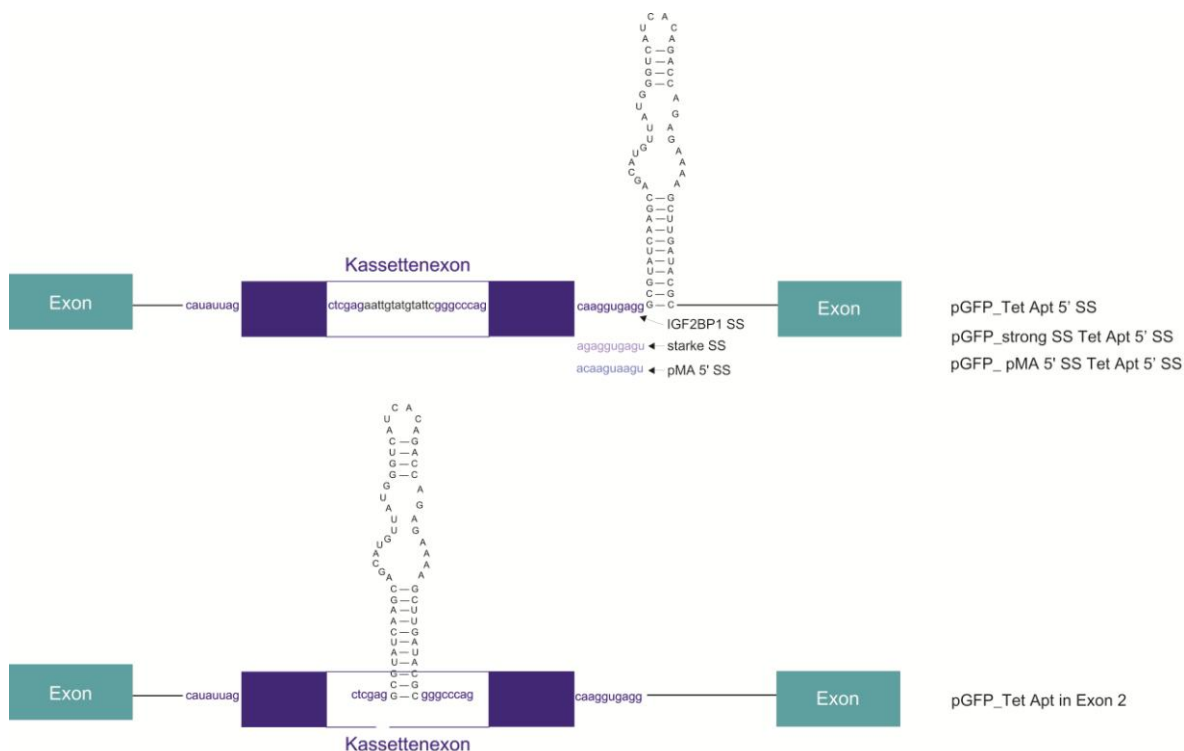


Abbildung 4-51: Schematische Darstellung der GFP-Minigen-Konstrukte.

Das TetR bindenden Aptamer liegt hinter der im GFP-Minigen enthaltenen 5'-Spleißstelle aus IGF2BP1 (pGFP_Tet Apt 5' SS), der starken 5'-Spleißstelle¹²⁶ (pGFP_strong SS Tet Apt 5' SS) und der 5'-Spleißstelle aus Intron 2 des pMA-Minigen (pGFP_pMA 5' SS Tet Apt 5' SS). Ein weiteres Konstrukt beinhaltet das TetR bindende Aptamer im Exon 2 (pGFP_Tet Apt in Exon 2).

Für die Konstrukte wurde wieder das TetR bindende Aptamer 12_1R mit dem 11 bp langen Stamm verwendet. Dieses wurde analog zu den pMA-Minigen-Konstrukten direkt *downstream* der 5'-Spleißstelle inseriert. Dieses Konstrukt wurde mit drei verschiedenen 5'-Spleißstellen kombiniert (siehe Tabelle 4-2). Es wurden die im GFP-Minigen enthaltene 5'-Spleißstelle aus IGF2BP1 im Intron 2 („pGFP_Tet Apt 5' SS“), die im pMA-Minigen¹²⁵ im Intron 2 enthaltenen 5'-Spleißstelle („pGFP_pMA 5' SS Tet Apt 5' SS“) bzw. die bereits im pMA-Minigen getestete starke Spleißstelle¹²⁶ (Kap. 4.3.3.3.2, „pGFP_strong SS Tet Apt 5' SS“) verwendet. Die beiden bereits im pMA-Minigen getesteten Spleißstellen haben mehr Ähnlichkeit mit der Konsensussequenz einer 5'-Spleißstelle als die aus IGF2BP1 entnommene Spleißstelle und sind daher als stärker zu werten. Die Konstrukte wurden von Carla Eller im Rahmen einer Bachelorarbeit kloniert und getestet.

Zusätzlich wurde das das TetR bindende Aptamer 12_1R in das Kassettenexon kloniert. Hierzu wurde die in den anderen Konstrukten im Exon 2 enthaltene Bindesequenz der PUF-Domäne des humanen Pumilio 1 Proteins durch das TetR bindende Aptamer ersetzt („pGFP_Tet Apt in Exon 2“). Das Spleißverhalten dieses Konstrukts wurde im Rahmen einer Bachelorarbeit von Carla Eller untersucht.

4.3.4.1 Klonierung des TetR bindenden Aptamers in Exon II von GFP-Minigen

Als Ausgangsvektor diente der Vektor pGFP von Wang *et al.*¹¹⁶. Der Vektor wurde mit den Oligonukleotiden fwd_exon1 gfp und rev_exon3 gfp sequenziert. In Abbildung 4-52 ist der sequenzierte Ausschnitt der Vektorkarte gezeigt.

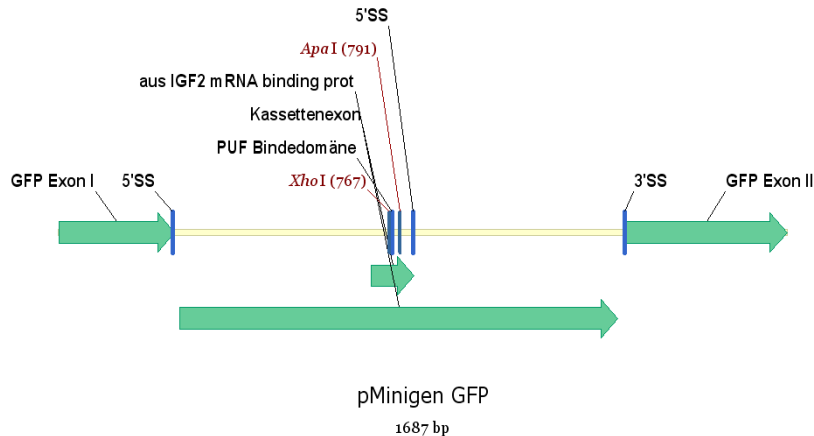


Abbildung 4-52: Ausschnitt der Vektorkarte von pGFP von Wang *et al.*¹¹⁶.

Das Minigen besitzt drei Exons (grüne Pfeile) unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Exon I und III stammen von gfp und Exon II und die beiden Introns aus IGF2BP1. Das Kassettenexon beinhaltet eine Bindestelle für das humane Pumilio1 Protein (PUF Bindedomäne).

Der Vektor pGFP codiert für das GFP-Minigen unter einem CMV-Promotor und enthält eine Kanamycinresistenz. Für die Klonierung des TetR bindenden Aptamers in Exon 2 wurden die komplementären Oligonukleotide fwd_xhoI TetR apt apaI und rev_xhoI TetR apt apaI durch 5 min Inkubation bei 95°C und langsames Abkühlen aneinander gelagert und anschließend phosphoryliert. Da die Oligonukleotide bereits so entworfen wurden, dass die entstehenden Überhänge den nach der Restriktion vorliegenden Überhängen entsprachen, musste das Fragment nicht mehr geschnitten werden. Der Vektor des Minigens pGFP wurde mit XhoI und ApaI geschnitten und mit dem Insert ligiert. *E. coli* DH5α wurde mit dem Ligationsansatz transformiert. Die Insertion des Aptamers in der gewünschten Orientierung wurde mittels Sequenzierung mit dem Oligonukleotid fwd_Exon I GFP bestätigt. In Abbildung 4-53 ist der erhaltene Vektor pGFP_TetR Apt in Exon 2 dargestellt.

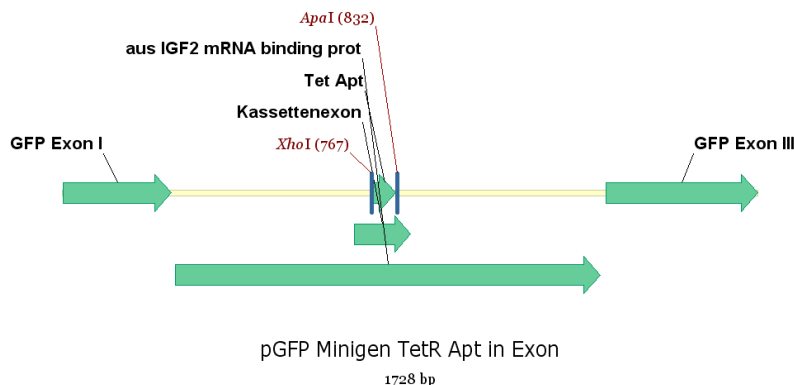


Abbildung 4-53: Ausschnitt der Vektorkarte des GFP-Minigenvektors pGFP Minigen TetR Apt in Exon. Das Minigen besitzt drei Exons (grüne Pfeile) unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Exon I und III stammen von gfp und Exon II und die beiden Introns aus IGF2BP1. Das Kassettenexon beinhaltet das TetR bindende Aptamer (TetR Apt).

4.3.4.2 Analyse des Spleißmusters des GFP-Minigens

Die GFP-Minigen-Konstrukte wurde zusammen mit dem TetR exprimierenden Vektor in HEK293-Zellen transfiziert. In vorherigen Versuchen zeigte sich, dass bei dem GFP-Minigen ein 10-facher Überschuss an TetR exprimierendem Vektor die stärksten Effekte zeigte, weshalb im Folgenden ein 10-facher Überschuss verwendet wurde. Nach 24 h wurde die RNA präpariert, in cDNA umgeschrieben und das Spleißmuster mit einer PCR mit den Oligonukleotiden fwd_exon1 gfp und rev_exon3 gfp analysiert. Das Oligonukleotid fwd_exon1 gfp bindet im Exon 1, während das reverse Oligonukleotid rev_exon3 gfp im Exon 3 bindet. Die Inklusionsraten wurden aus den Gelbildern nur abgeschätzt, da eine Quantifizierung durch das Auftreten unspezifischer Banden nicht möglich war. Ein exemplarisches Gel zur Analyse des Spleißmusters für die unterschiedlichen 5'-Spleißstellen ist in Abbildung 4-54 gezeigt.

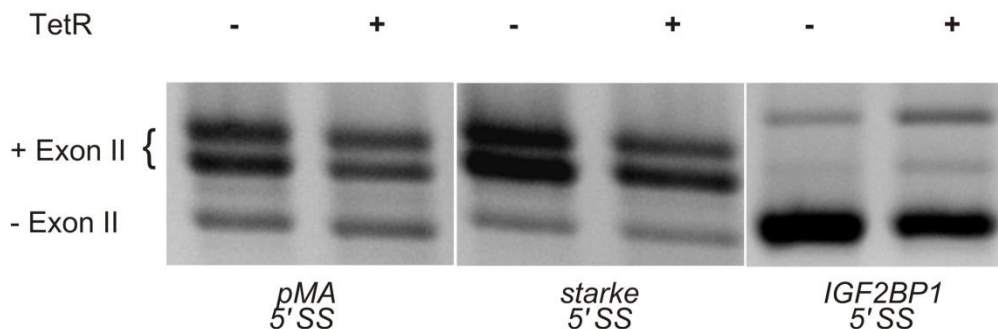


Abbildung 4-54: Gel zur Analyse des Spleißmusters (2% Agarose für pMA und starke 5' SS und 3% Agarose für IGF2BP1 5' SS) für unterschiedliche Spleißstellen im GFP-Minigen mit dem TetR bindenden Aptamer direkt *downstream* der 5'-Spleißstelle (5' SS).

Aufgetragen ist: Konstrukt mit 5'-Spleißstelle aus dem pMA-Minigen (pMA 5' SS), mit der starken 5'-Spleißstelle (starke 5' SS) und der im GFP-Minigen enthaltenen Spleißstelle aus IGF2BP1 (IGF2BP1 5' SS), jeweils ohne und mit 10-fachem Überschuss kotransfiziertem TetR exprimierendem Plasmid pWHE211_c-myc-NLS TetR. Die Transfektionen wurden einmal reproduziert.

Aus Abbildung 4-54 ist ersichtlich, dass die Primer für das GFP-Minigen in der Spleiß-PCR zwei Banden für die Inklusion des Exons 2 ergaben. Durch Sequenzierung konnte bestätigt werden, dass beide Banden das Exon 2 enthalten. Der reverse Primer bindet somit unspezifisch ein weiteres Mal im Exon 3.

Für die 5'-Spleißstelle aus dem pMA-Minigen (pMA 5' SS) lag die Inklusionsrate ohne TetR bei ca. 60% und sank auf ca. 50% in Anwesenheit von TetR. Das Inklusionslevel der starken 5'-Spleißstelle (starke 5' SS) ohne TetR lag deutlich höher bei ca. 80%. Hier wurde die Inklusion des Exons 2 durch Zugabe von TetR auf ein Level von ca. 60% gesenkt. Die im GFP-Minigen bereits enthaltene 5'-Spleißstelle aus dem humanen *igf2bp1*-Gen (IGF2BP1 5' SS) zeigte in Abwesenheit von TetR eine deutlich höhere Exklusion als die anderen Spleißstellen. Das Inklusionslevel lag hier bei ca. 10%. Dieses Inklusionslevel konnte durch die Expression von TetR auf ca. 25 % gesteigert werden.

Ergebnisse

In einem weiteren Konstrukt wurde das TetR bindende Aptamer in das Exon 2 des GFP-Minigens inseriert. Mit diesem Konstrukt wurden HEK293-Zellen transfiziert. Kotransfiziert wurden Plasmide, die für verschiedene TetR-Fusionsproteine codieren. Zum einen wurde TetR mit der Spleißaktivator-domäne von ASF fusioniert und zum anderen mit der Spleißrepressor-domäne von hnRNPA1. Das nach der RNA-Präparation, cDNA-Synthese und PCR entstandene Gel ist in Abbildung 4-55 dargestellt.

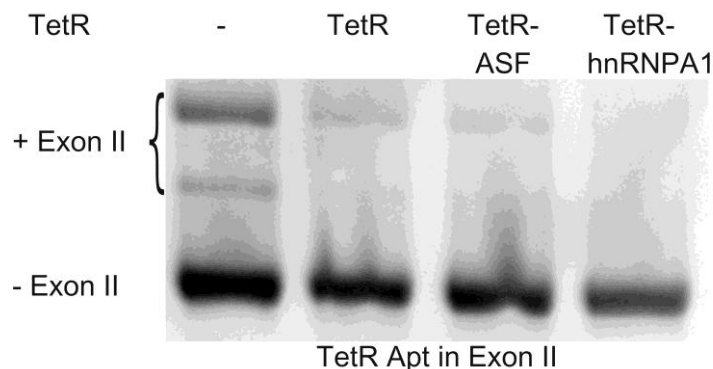


Abbildung 4-55: Gel zur Analyse des Spleißmusters (3% Agarose) für GFP-Minigen mit TetR bindenden Aptamer im Exon 2.

Gezeigt ist der Zustand ohne (-) bzw. mit 19-fachem Überschuss an TetR (TetR) oder dem Fusionsprotein aus TetR und der *Enhancer*-Domäne von ASF (TetR-ASF) bzw. aus TetR und der *Silencer*-Domäne von hnRNPA1 (TetR-hnRNPA1). Die Transfektion wurde einmal reproduziert.

Es zeigte sich, dass das Minigen „TetR Apt in Ex II“ wieder zwei Inklusionsbanden in unterschiedlicher Stärke aufweist (Abbildung 4-55). Die höhere ist deutlich stärker als die untere. Wurde TetR oder das Fusionsprotein TetR-ASF exprimiert, sank das Inklusionslevel auf weniger als ca. 10% ab und die untere der Inklusionsbanden war kaum noch sichtbar. Bei der Expression des Fusionsproteins TetR-hnRNP A1 war keine Inklusion von Exon 2 mehr beobachtbar. Die beiden Fusionsproteine scheinen demnach wie TetR den Zugang zur Spleißstelle zu behindern und nicht als Spleiß-*Enhancer* bzw. -*Silencer* zu wirken.

Da der Regulationseffekt bei dem Fusionsprotein TetR-hnRNP A1 stärker war, wurde dieses im Folgenden weiter verwendet.

Um zu überprüfen, ob der Effekt durch die Bindung von TetR an das Aptamer bedingt ist, wurden HEK293-Zellen nach der Transfektion mit dem Minigen und dem TetR-hnRNP A1 exprimierenden Plasmid 24 h in An- und Abwesenheit von 50 µM Doxycyclin inkubiert und das Spleißmuster wie bereits beschrieben analysiert. Das Gel zur Analyse des Spleißmusters ist in Abbildung 4-56 gezeigt.

Ergebnisse

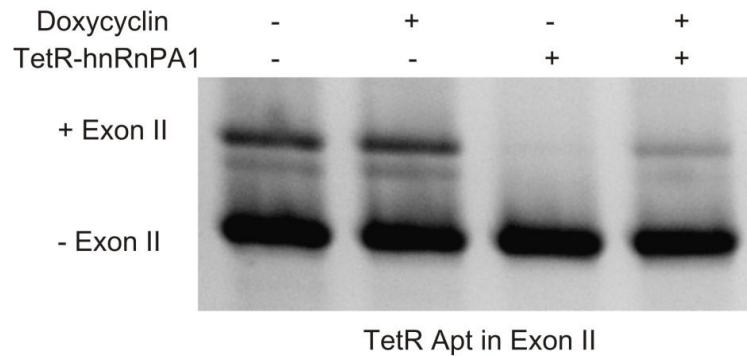


Abbildung 4-56: Gel zur Analyse des Spleißmusters (2% Agarose) für GFP-Minigen mit TetR bindenden Aptamer im Exon 2.

Gezeigt ist der Zustand ohne (-) bzw. mit 19-fachem Überschuss des Fusionsproteins aus TetR und der *Silencer*-Domäne von hnRNP A1 (+) in Ab- (-) und Anwesenheit (+) von 50 μ M Doxycyclin.

Aus Abbildung 4-56 ist ersichtlich, dass Doxycyclin allein keinen Einfluss auf das Spleißmuster des Minigens hatte. Hier lag das Inklusionslevel für beide Proben bei ca. 25%. Durch die Expression von TetR-hnRNP A1 in Abwesenheit von Doxycyclin wurde die Inklusion von Exon 2 komplett inhibiert und konnte durch Zugabe von Doxycyclin zumindest teilweise wieder rückgängig gemacht werden. Hier war ein Inklusionslevel von ca. 10% beobachtbar. Dies lässt darauf schließen, dass der beobachtete Inhibitorseffekt der Inklusion von Exon 2 auf das Binden des TetR-Fusionsproteins an das TetR bindende Aptamer zurückzuführen ist.

Zusammenfassend konnte das Spleißen der beiden getesteten Minigene erfolgreich über das TetR bindenden Aptamer reguliert werden.

4.3.5 Regulation des alternativen Spleißens im mRNA-Kontext der Luziferase

Im Weiteren sollte nun die Regulation im Kontext einer translatierten mRNA getestet werden. Hierzu wurde die Firefly Luziferase herangezogen. Da das synthetische Luziferasegen (*luc*) keine Introns enthält, musste zuerst ein Testsystem mit Introns geschaffen werden. Hierzu wurden die Introns aus dem pMA-Minigen in das *luc* Gen inseriert. Es wurden mehrere Varianten entworfen, welche in Abbildung 4-57 dargestellt sind.

Ergebnisse

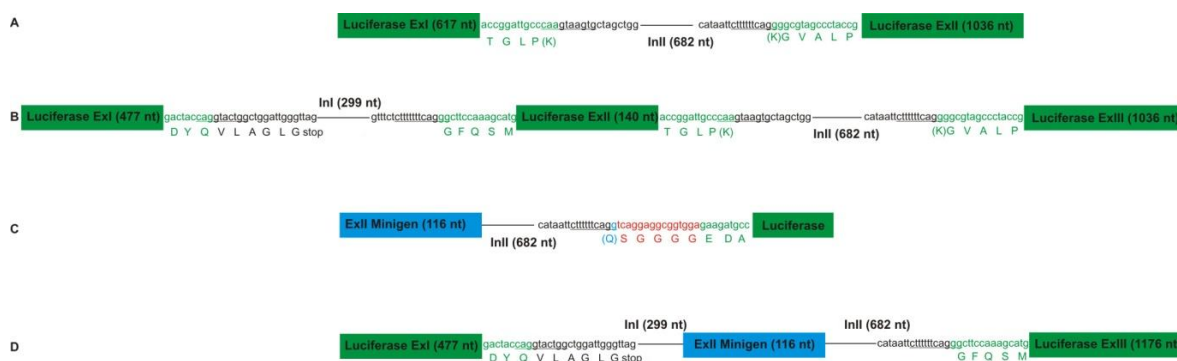


Abbildung 4-57: Schematische Darstellung der Luciferase-Konstrukte mit Introns.

A: Intron 2 aus dem pMA-Minigen wurde in die Firefly Luciferase inseriert. **B:** Intron 2 und Intron 1 aus dem pMA-Minigen wurden in die Luciferase inseriert; nur die Inklusion von Exon 2 ergibt eine funktionelle Luciferase. **C:** Exon 2 und Intron 2 aus dem pMA-Minigen wurden 5' vor das Luciferasegen gesetzt und über einen Ser-Gly₄-Linker (rot) mit der Luciferase verbunden. **D:** Exon 2 wurde zusammen mit den flankierenden Introns 1 und 2 aus dem pMA-Minigen in die Luciferase inseriert; nur die Exklusion von Exon 2 führt zu einer funktionellen Luciferase.

Im ersten Konstrukt (A; InII in Luci) wurde das Intron 2 aus dem pMA-Minigen so in die Luciferase inseriert, dass der 5'- und 3'-Kontext der Spleißstellen bestmöglich erhalten blieb. Wird das Intron nicht korrekt heraus gespleißt, kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters und es entsteht kein funktionelles Protein. Für ein weiteres Konstrukt (B, InI + InII in luci) wurde zusätzlich das Intron I aus dem pMA-Minigen in die Luciferase eingebracht. Hier wurde ebenfalls versucht, den Kontext der 5'- und 3'-Spleißstelle in den angrenzenden Exons zu erhalten. Wird das Intron 1 nicht korrekt gespleißt, entsteht ein Stoppcodon. Es entstand ein Konstrukt mit drei Exons, was eine funktionellen Luciferase ergibt, wenn beide Introns getrennt gespleißt werden und es zur Inklusion des Exons 2 kommt.

Des Weiteren wurden das Exon 2 und das darauf folgende Intron 2 über einen Ser-Gly₄-Linker *upstream* des Luciferasegens inseriert (C, ExII + InII vor luci), sodass zwei Exons entstanden, eines aus dem pMA-Minigen Exon 2 und eines aus dem kompletten *luc* Gen. Wird hier das Intron nicht korrekt gespleißt, verschiebt sich das Leseraster. Dadurch kann keine funktionelle Luciferase exprimiert werden.

Für das letzte Konstrukt (D, ExII in Luci) wurde das Exon 2 mit seinen angrenzenden Introns 1 und 2 aus dem pMA-Minigen in die Luciferase inseriert. Hier wurde die gleiche Insertionsstelle gewählt wie zuvor für das Intron 1 im Konstrukt B (InI + InII in luci). In diesem Konstrukt muss das Exon 2 heraus gespleißt werden, damit es nicht zu einer Verschiebung des Leserasters kommt. Demnach ermöglicht hier, im Gegensatz zu Konstrukt B (InI + InII in Luci), die Exklusion des Exons 2 eine Luciferaseexpression.

4.3.5.1 Konstrukte der Luciferase mit TetR bindendem Aptamer

In die vorgestellten Konstrukte wurde in das TetR bindende Aptamer inseriert, um den Spleißprozess der Luciferase-mRNA zu regulieren. Die Variationen in den einzelnen Konstrukte sind schematisch in Abbildung 4-58 gezeigt und die Konstrukte werden in Abbildung 4-59 ausführlicher dargestellt.

Ergebnisse

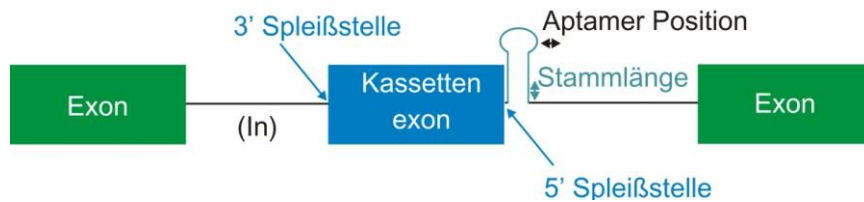


Abbildung 4-58: Schematische Darstellung der Variationen in den Luziferase-Konstrukten. Zur Optimierung des Effekts wurden verschiedene 3'- und 5'-Spleißstellen am Kassettenexon getestet und die Position des Aptamers zwischen an der 5'-Spleißstelle variiert.

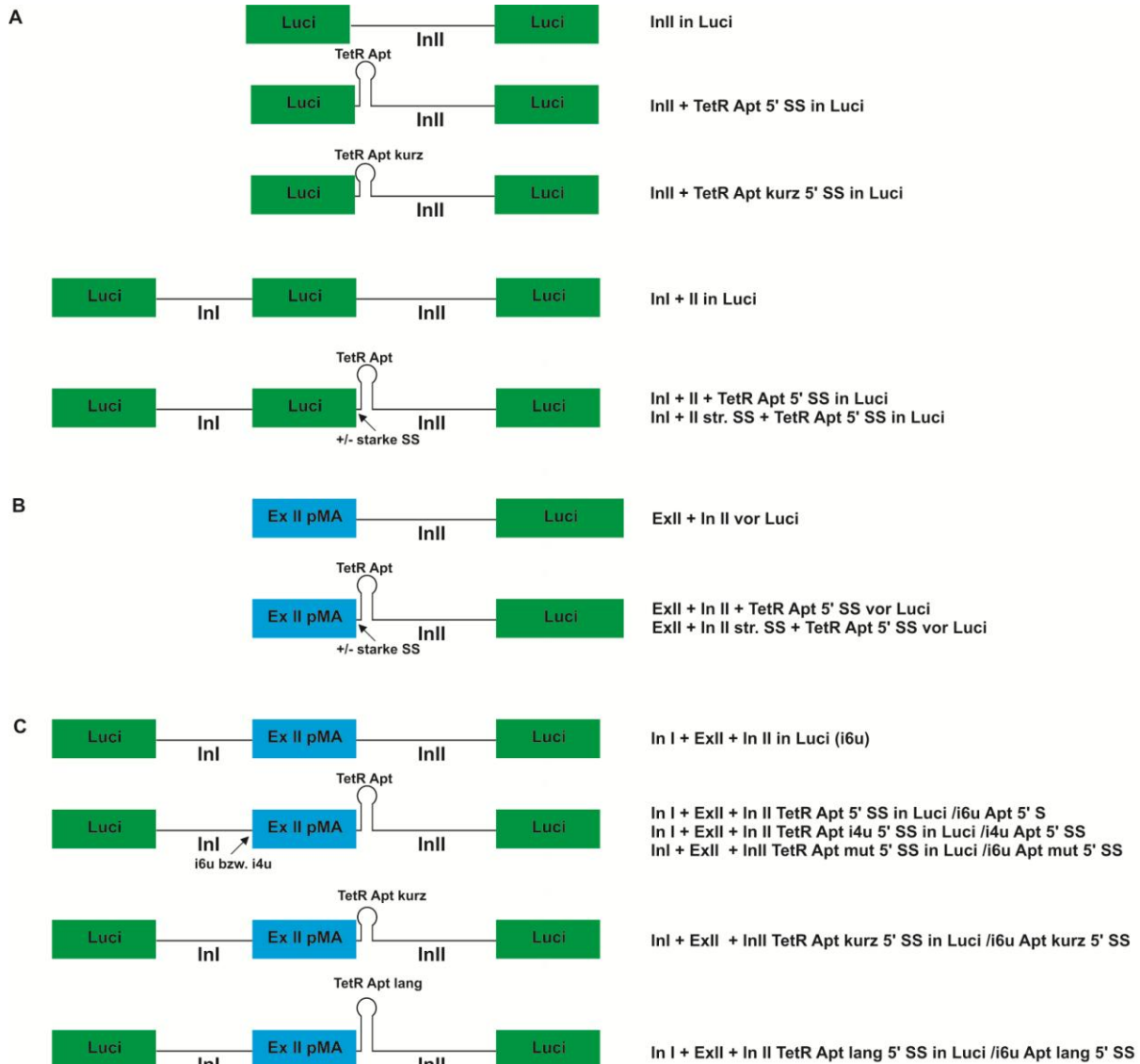


Abbildung 4-59: Schematischer Überblick über die getesteten Luziferase-Konstrukte.

Exons sind als Kästen gezeigt und Introns als Linien. A: Konstrukte mit Intron 2 (In II) aus dem pMA-Minigen innerhalb der Luziferase (Luci, grün). Direkt *downstream* der 5'-Spleißstelle wurde das TetR bindende Aptamer (TetR Apt) mit einem 11 bzw. 7 bp langen Stamm inseriert. Zusätzlich gezeigt sind Konstrukte mit Intron 1 (In I) und 2 (In II) aus dem pMA-Minigen innerhalb der Luziferase. Hier wurde das TetR bindende Aptamer direkt *downstream* der 5'-Spleißstelle aus dem pMA-Minigen bzw. der starken Spleißstelle inseriert. B: Konstrukte mit Exon 2 (Ex II pMA, blau) und Intron 2 (In II) aus dem pMA-Minigen *upstream* der Luziferase. Das TetR bindende Aptamer wurde direkt *downstream* der 5'-Spleißstelle aus dem pMA-Minigen bzw. der starken Spleißstelle inseriert. C: Konstrukte mit Intron 1 (In I), Exon 2 (Ex II pMA) und Intron 2 (In II) aus dem pMA-Minigen innerhalb der Luziferase. Das TetR bindende Aptamer wurde direkt *downstream* der 5'-Spleißstelle aus dem pMA-Minigen inseriert. In diesem Konstrukt wurden die 3'-Spleißstellen „i6u555“ und „i4u555“ getestet. Es wurde das TetR bindende Aptamer mit einem 7 bp (TetR Apt kurz) bzw. mit einem 17 bp (TetR Apt lang) Stamm verwendet.

Für die Konstrukte mit dem Intron 2 aus dem pMA-Minigen innerhalb der Luziferase („In II in Luci“) wurde das TetR bindende Aptamer 12_1R mit einem 11 bp langen Stamm („In II + TetR Apt 5' SS in Luci“) und eine destabilisierte Variante mit einem 7 bp langen Stamm („In II + TetR Apt kurz 5' SS in Luci“) direkt *downstream* der 5'-Spleißstelle im Intron 2 inseriert. Bei den Konstrukten mit Intron 1 und 2 aus dem pMA-Minigen innerhalb der Luziferase („In I + II in Luci“) wurden die 5'-Spleißstellen aus dem pMA-Minigen („In I + II + TetR Apt 5' SS in Luci“) und die starke Spleißstelle¹²⁶ („In I + II str. SS + TetR Apt 5' SS in Luci“) *upstream* des TetR bindenden Aptamers getestet (siehe Tabelle 4-2). Diese beiden Spleißstellen wurden auch in den Konstrukten mit Exon 2 und Intron 2 aus dem pMA-Minigen *upstream* der Luziferase genutzt („Ex II + In II + TetR Apt 5' SS vor Luci“ und „Ex II + In II str. SS + TetR Apt 5' SS vor Luci“).

In weiteren Konstrukten wurden Intron 1, Exon 2 und Intron 2 aus dem pMA-Minigen in den codierenden Bereich der Luziferase inseriert („In I + Ex II+ In II in Luci“). Hier wurden unterschiedliche Stammlängen für das Aptamer verwendet. Es wurde das Aptamer mit dem 11 bp langen Stamm („In I + Ex II + In II TetR Apt 5' SS in Luci), das destabilisierte Aptamer mit einem 7 bp langen Stamm („In I + Ex II + In II TetR Apt kurz 5' SS in Luci“) und eine stabilisierte Aptamervariante mit einem 17 bp langen Stamm („In I + Ex II + In II TetR Apt lang 5' SS in Luci“) kloniert. Diese Konstrukte enthalten alle die 3'-Spleißstelle „i6u555“ aus dem pMA-Minigen (siehe Tabelle 4-2). Es wurde auch die schwächere 3'-Spleißstelle „i4u555“ getestet („In I + Ex II + In II TetR Apt i6u 5' SS in Luci“). Zur Kontrolle wurde das mutierte Aptamer verwendet, was von TetR nicht mehr gebunden wird („In I + Ex II + In II TetR Apt mut 5' SS in Luci“).

4.3.5.1.1 Klonierung des Vektors pGL4.10_CMV

Als Ausgangsvektor für sämtliche Klonierungen mit der Firefly Luziferase wurde der Vektor pGL4.10 genutzt. Dieser ist in Abbildung 4-50 dargestellt.

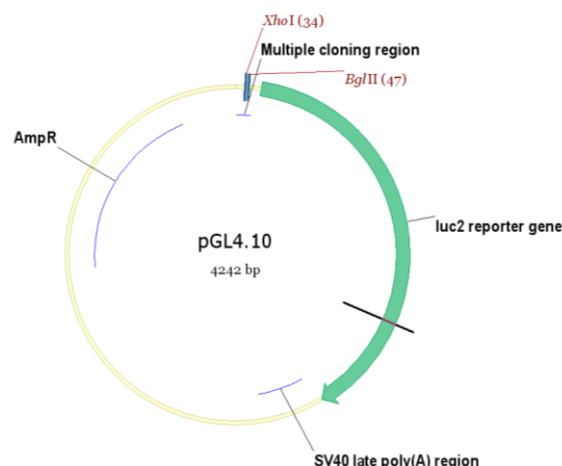


Abbildung 4-60: Vektorkarte für pGL4.10.

Der Vektor codiert für die Firefly Luziferase (luc2 reporter gene, grüner Pfeil) *downstream* einer *multiple cloning region* mit einer PolyA-Sequenz aus SV40. Des Weiteren ist eine Ampicillinresistenz (AmpR) enthalten.

Der Ausgangsvektor pGL4.10 Vektor (Abbildung 4-60) codiert für die Firefly Luziferase, allerdings ist in diesem Vektor kein Promotor für die Luziferase enthalten. Des Weiteren codiert der Vektor für eine β -Lactamase, welche die Ampicillinresistenz vermittelt.

Der CMV-Promotor stand im Vektor pWHE211-TetR-CTCF (Abbildung 4-29; Kap.3.1.7) zur Verfügung und wurde mit den Oligonukleotiden Fwd3_CMV pWHE211 inkl. *Xho*I, welches eine *Xho*I-Schnittstelle und Rev_CMV+*Bgl*II, welches eine *Bgl*II-Schnittstelle einführt, amplifiziert. Das PCR-Produkt und der Vektor pGL4.10 wurden mit *Xho*I und *Bgl*II geschnitten und ligiert. *E. coli* DH5 α wurde mit dem Ligationsansatz transformiert. Die Insertion des Promotors in der gewünschten Orientierung sowie der Ausschluss von Sekundärmutationen wurde mittels Sequenzierung mit den Oligonukleotiden Fwd3_CMV pWHE211 inkl. *Xho*I und Rev_CMV+*Bgl*II, bestätigt. In Abbildung 4-61 ist der erhaltende Vektor pGL4.10_CMV dargestellt.

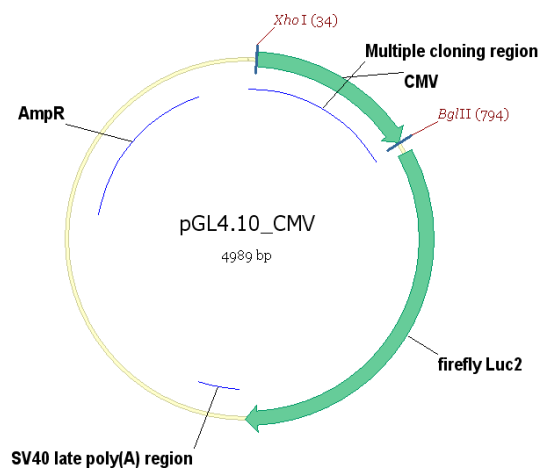


Abbildung 4-61: Vektorkarte für pGL4.10_CMV.

Der Vektor codiert für die Firefly Luziferase (*luc2* reporter gene) kontrolliert durch einen CMV-Promotor mit einer PolyA-Sequenz aus SV40. Des Weiteren ist eine Ampicillinresistenz (AmpR) enthalten. Gene und funktionale Elemente sind als Pfeile dargestellt.

4.3.5.1.2 Insertion von Intron 1 und 2 in die Firefly Luziferase

Die Introns 1 und 2 wurden aus dem Vektor pMA_CMV i6u555 entnommen. In Tabelle 4-3 sind die für die PCR verwendeten Primerpaare zur Amplifikation der Intron- und Exonfragmente aufgeführt. In Tabelle 4-4 ist aufgeführt, welche Fragmente aus Tabelle 4-3 für die *overlap* PCR der einzelnen Konstrukte eingesetzt wurden.

Tabelle 4-3: Für die Amplifikation der einzelnen Fragmente verwendete Primerpaare

Fragmente	Primerpaar für Exon aus pGL4.10
A	Fwd_pGL4 vor ATG Rev_pGL4 luci ExI (UH IntronI)
B	Fwd_pGL4 vor ATG Rev_pGL4 ExII (UH Intron II)-Apt
C	Fwd_pGL4 vor ATG Rev_pGL4 ExII (UH Intron II)
D	Fwd_pGL4 ExII (UH IntronI) Rev_pGL4 ExII (UH Intron II)-Apt
E	Fwd_pGL4 ExII (UH IntronI) Rev_pGL4 ExII (UH Intron II)
F	Fwd_pGL4 ExII (UH Intron I) Rev_pGL4 ExII (UH Intron II strSS)
G	Fwd_pGL4 exon III (UH Intron II) Rev_ex III hinter bbvCI
H	Fwd_pGL4 ExII (UH IntronI) Rev_ex III hinter bbvCI
Primer für Intron aus pMA_CMV_i6u555 bzw. pMA_CMV_i6u555 TetR Apt 5'SS	
I	Fwd_pGL4 intron I (UH exI) Rev_pGL4 IntronI (UH ExII)
J	Fwd_pGL4 intron II (UH ExII)-Apt Rev_pGL4 intron II (UH ExIII)
K	Fwd_pGL4 intron II (UH ExII) Rev_pGL4 intron II (UH ExIII)
L	Fwd_InII strong SS(UH ExII) Rev_InII (UH ExII)

Tabelle 4-4: Verwendete Fragmente für *overlap* PCR der einzelnen Konstrukten

Konstrukt	verwendete Fragmente
InII in Luci	B, J, G
In II + TetR Apt 5' SS in Luci	C, K, G
In I in Luci	A, I, H
In I + In II in Luci	A, I, D, J, G
In I + In II + TetR Apt in Luci	A, I, E, K, G
In I + In II str. SS + TetR Apt 5' SS in Luci	A, I, F, K, G

Die PCR-Produkte und der Vektor pGL4.10 wurden mit den Restriktionsenzymen NcoI und BbvCI geschnittenen, ligiert und *E. coli* Top 10 mit dem Ansatz transformiert. Die Insertion der Introns in der gewünschten Orientierung sowie der Ausschluss von Sekundärmutationen wurden mittels Sequenzierung mit dem Oligonukleotid Fwd_pGL4 vor ATG bestätigt. Anschließend wurde der CMV-Promotor wie in Kap. 4.3.5.1.1 beschrieben eingefügt. Stellvertretend für die erhaltenen Vektoren sind in Abbildung 4-62 pGL4.10_CMV InI in Luci und in Abbildung 4-63 pGL4.10_CMV InI + InII + TetR Apt 5'SS in luci dargestellt.

Ergebnisse

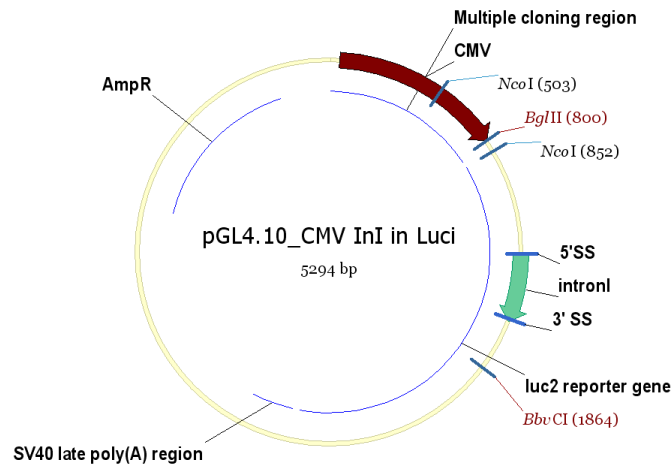


Abbildung 4-62: Vektorkarte für pGL4.10_CMV InI in Luci.

Der Vektor codiert für die Firefly Luziferase (*luc2* reporter gene), in welche das Intron 1 (grüner Pfeil) inseriert wurde, kontrolliert durch einen CMV-Promotor (roter Pfeil) und enthält eine Ampicillinresistenz (AmpR).

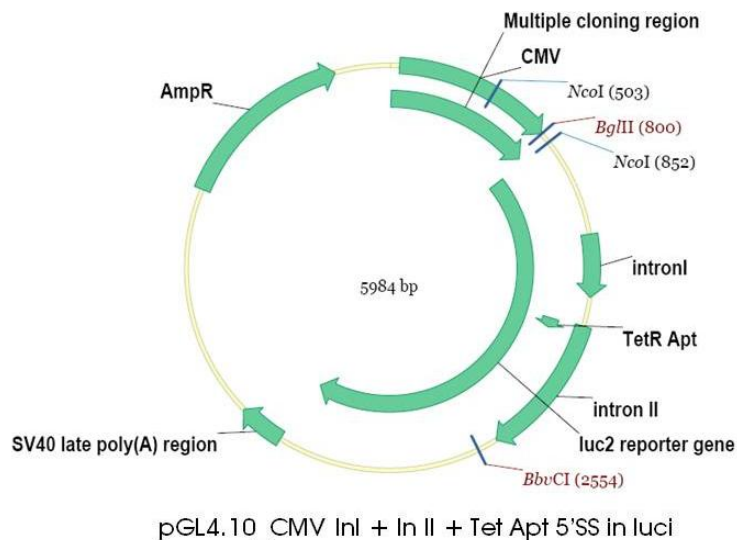


Abbildung 4-63: Vektorkarte für pGL4.10_CMV InI + In II + TetR Apt 5' SS in Luci.

Der Vektor codiert für die Firefly Luziferase (*luc2* reporter gene), in welche Intron 1 und 2 inseriert wurden sowie das TetR bindende Aptamer (TetR Apt). Kontrolliert wird die Expression durch einen CMV-Promotor und der Vektor enthält eine Ampicillinresistenz (AmpR). Gene und funktionale Elemente sind als Pfeile dargestellt.

4.3.5.1.3 Insertion von Exon 2 und Intron 2 upstream der Firefly Luziferase

In einem weiteren Konstrukt wurde das Exon 2 zusammen mit dem Intron 2 aus dem Minigen pMA_i6u555 mit einem Ser-Gly₄-Linker N-terminal an die Firefly Luziferase fusioniert. Hierzu wurde eine PCR über pMA_CMV_i6u555, pMA_CMV_i6u555 TetR Apt 5' SS bzw. pMA_CMV_i6u555 strong SS TetR Apt 5' SS als Matrize mit den Oligonukleotiden Fwd_ExII i6u555 + NcoI und Rev_InII i6u555 + SG4 + ApaI durchgeführt. Das Oligonukleotid Fwd_ExII i6u555 + NcoI führte eine NcoI-Schnittstelle und das Oligonukleotid Rev_InII i6u555 + SG4 + ApaI den Ser-Gly₄-Linker und eine ApaI-Schnittstelle ein. Die PCR-Produkte und der Vektor pGL4.10 wurden mit NcoI und ApaI restringiert und ligiert. *E. coli* Top 10 wurde mit dem Ligationsansatz transformiert. Die Insertion der Introns in der gewünschten Orientierung sowie der Ausschluss von Sekundärmutationen wurden mittels Sequenzierung

mit dem Oligonukleotid Fwd_pGL4 vor ATG bestätigt. Anschließend wurde der CMV-Promotor wie in Kap. 4.3.5.1.1 beschrieben eingefügt. Stellvertretend für die erhaltenen Vektoren ist in Abbildung 4-64 pGL4.10_CMV ExII + InII + TetR Apt 5' SS vor luci dargestellt.

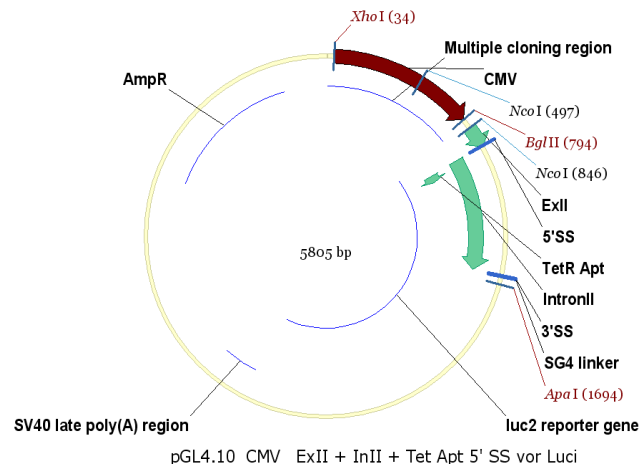


Abbildung 4-64: Vektorkarte für pGL4.10_CMV ExII + InII + Tet Apt 5' SS vor Luci. Der Vektor codiert für die Firefly Luziferase (*luc2 reporter gene*), kontrolliert durch einen CMV-Promotor (roter Pfeil). Exon 2 und Intron 2 mit dem TetR bindenden Aptamer wurden 5' der Luziferase inseriert. Der Vektor enthält zusätzlich eine Ampicillinresistenz (AmpR). Gene und funktionale Elemente sind als Pfeile dargestellt.

4.3.5.1.3.1 Klonierung von pGL4.10_CMV ExII vor luci

Das in Kap. 4.3.5.1.3 klonierte Plasmid pGL4.10_CMV ExII + InII vor luci wurde als Matrize für eine PCR mit den Oligonukleotiden Fwd_in CMV vor BglII und Rev2_i6u555 ExII + SG4 + ApaI eingesetzt, wobei das Oligonukleotid Rev2_i6u555 ExII + SG4 + ApaI den SG₄-Linker und eine ApaI Schnittstelle einbringt. Das PCR-Produkt sowie der Vektor pGL4.10_CMV ExII + InII wurden mit den Restriktionsenzymen BglII und ApaI geschnitten ligiert. *E. coli* DH5α wurde mit dem Ligationsansatz transformiert. Die Insertion des Exons in der gewünschten Orientierung sowie der Ausschluss von Sekundärmutationen wurden mittels Sequenzierung mit dem Oligonukleotid Fwd_in CMV vor BglII bestätigt. Der erhaltene Vektor pGL4.10_CMV ExII vor luci ist in Abbildung 4-65 dargestellt.

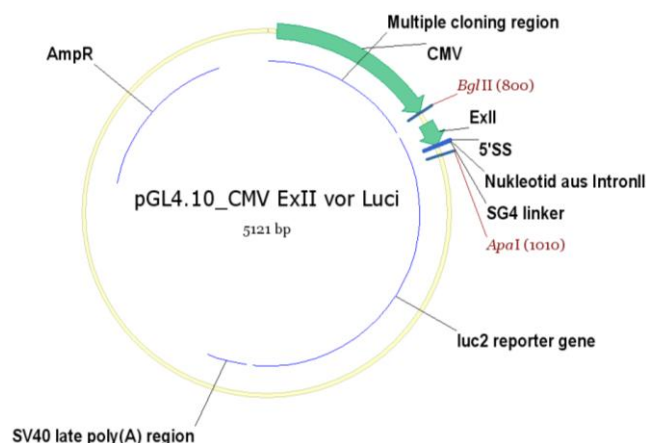


Abbildung 4-65: Vektorkarte für pGL4.10_CMV ExII vor Luci. Der Vektor codiert für die Firefly Luziferase (*luc2 reporter gene*), kontrolliert durch einen CMV-Promotor. Exon 2 wurde 5' der Luziferase inseriert. Der Vektor enthält zusätzlich eine Ampicillinresistenz (AmpR). Gene und funktionale Elemente sind als Pfeile dargestellt.

4.3.5.1.4 Insertion von Intron 1, Exon 2 und Intron 2 in Firefly Luziferase

Für die Insertion des Exon 2 aus dem pMA-Minigen wurde eine PCR über den Vektor pGL4.10 als Matrize mit den Oligonukleotiden Fwd_pGL4 vor ATG und Rev_pGL4 ExI (UH InI pMA) bzw. Fwd_pGL4 ExIII (UH InII pMA) und Rev_ex III hinter BbvCI durchgeführt. Des Weiteren wurden PCRs mit den Oligonukleotiden Fwd_pMA InI (UH ExI luci) und Rev_pMA InII (UH ExIII luci) über die Plasmide pMA_CMV_i6u555, pMA_CMV_i6u555 TetR Apt 5'SS, pMA_CMV_i6u555 TetR Apt kurz 5'SS, pMA_CMV_i6u555 TetR Apt lang 5'SS, pMA_CMV_i6u555 TetR Apt mut 5'SS, pMA_CMV_i6u555 strong SS TetR Apt 5'SS und pMA_CMV_i4u555 TetR Apt 5'SS, welche in Kap. 4.3.3.2.1 bzw. 4.3.3.3.1 kloniert wurden, durchgeführt. In einer *overlap* PCR mit den Oligonukleotiden Fwd_pGL4 vor ATG und Rev_ex III hinter BbvCI wurden die PCR-Produkte verbunden. Die PCR-Produkte und der Vektor pGL4.10_CMV wurden mit den Restriktionsenzymen ApaI und BbvCI geschnitten und ligiert. *E. coli* DH5α wurde mit dem Ligationsansatz transformiert. Die Insertion des Exons mit den flankierenden Introns in der gewünschten Orientierung sowie der Ausschluss von Sekundärmutationen, wurden mittels Sequenzierung mit dem Oligonukleotid Fwd_pGL4 vor ATG bestätigt. Stellvertretend für die erhaltenen Vektoren ist in Abbildung 4-66 pGL4.10_CMV i6u555 TetR Apt 5' SS Ex in luci dargestellt.

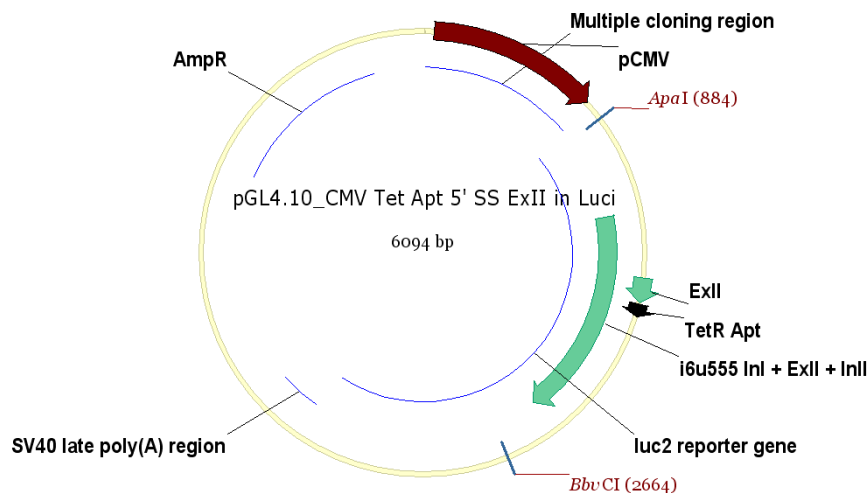


Abbildung 4-66: Vektorkarte für pGL4.10_CMV i6u555 TetR Apt 5' SS Ex in Luci.

Der Vektor codiert für die Firefly Luziferase (*luc2 reporter gene*), in welche Exon 2 mit seinen flankierenden Introns 1 und 2 inseriert wurde, kontrolliert durch einen CMV-Promotor (roter Pfeil). Das TetR bindende Aptamer (TetR Apt) liegt direkt 3'- der 5'-Spleißstelle im Intron 2. Der Vektor enthält eine Ampicillinresistenz (AmpR). Gene und funktionale Elemente sind als Pfeile dargestellt.

4.3.5.2 Einfluss der Introns auf die Luziferaseexpression

Zuerst wurde der Einfluss der Insertion der Introns auf die Expression der Luziferase untersucht. Hierzu wurden die Vektoren mit den Luziferase-Konstrukten in HEK293-Zellen transformiert. Der Vektor pGL4.75, der für die *Renilla* Luziferase codiert, wurde als Transfektionskontrolle kotransfiziert. Nach 24 h wurden die Luziferaseaktivitäten bestimmt und die Aktivität der Firefly Luziferase auf die der *Renilla* Luziferase der gleichen Probe normiert. Die Luziferasemessungen sind in Abbildung 4-67 dargestellt.

Ergebnisse

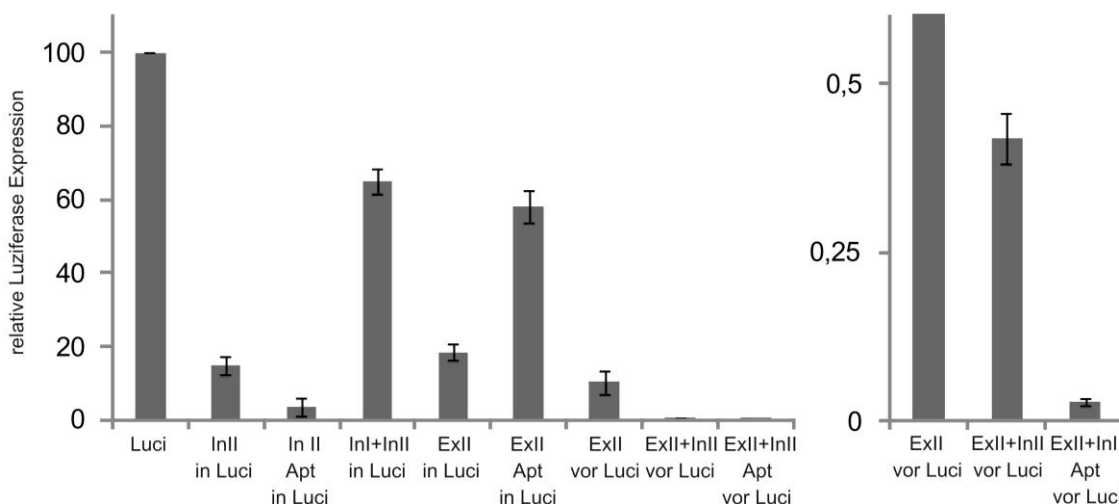


Abbildung 4-67: Luziferasemessungen für die Luziferasekonstrukte mit Intron im Vergleich mit der unveränderten Luziferase aus pGL4.10 (Luci).

Alle Messungen wurden auf die Expression der Firefly Luziferase des Vektor pGL4.10 normiert. Gezeigt sind die in Abbildung 4-57 und Abbildung 4-58 dargestellten Konstrukte. Rechts sind die Messungen der Konstrukte mit dem Exon 2 5' der Luziferase nochmals mit einem anderen Y-Achsenabschnitt gezeigt. Hier sind die Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Messungen mit Triplikaten und deren Standardabweichung als Fehlerbalken gezeigt.

Aus Abbildung 4-67 ist ersichtlich, dass die Expression der Firefly Luziferase durch die Insertion von Introns stark absank (vergleiche pGL4.10 ohne Introns, „Luci“ in Abbildung 4-67). Durch die Insertion des Introns 2 sank die Expression auf 15% ab („In II in Luci“). Durch die zusätzliche Insertion des Aptamers direkt *downstream* der 5'-Spleißstelle im Intron 2 sank die Expression auf 3% ab („In II Apt in Luci“). Wurden Intron 1 und Intron 2 in die Luziferase inseriert, wurde ein Expressionslevel von 65% erreicht („In I + In II in Luci“). Durch die Insertion der Introns und des Exon 2 aus dem pMA-Minigen sank das Expressionslevel auf 19% („Ex II in Luci“). Die zusätzliche Insertion des Aptamers erhöhte das Expressionslevel auf 58% („Ex II Apt in Luci“). Wurde das Exon 2 und das Intron 2 *upstream* der Firefly Luziferase inseriert („Ex II + In II vor Luci“), sank dadurch das Expressionsniveau der Luziferase auf 0,4%. Durch die Insertion des Aptamers („Ex II + In II Apt vor Luci“) sank das Expressionsniveau auf 0,03%. Wurde das Exon 2 jedoch ohne Intron *upstream* der Luziferase kloniert, sodass das Konstrukt vor der Translation nicht mehr gespleißt werden musste, konnte ein Expressionslevel der Luziferase von 10% beobachtet werden.

Da die Luziferaseaktivität jedoch trotz der Reduktion in einem gut detektierbaren Bereich lag, wurde der Einfluss von TetR auf die Luziferaseexpression der Konstrukte untersucht.

4.3.5.3 Analyse der Luziferaseexpression der Konstrukte mit TetR bindendem Aptamer

Die Luziferase-Konstrukte wurden zusammen mit dem TetR exprimierenden Vektor und dem die *Renilla* Luziferase exprimierenden Vektor in HEK293-Zellen kotransfiziert und 24 h in An- und Abwesenheit von 50 µM Doxycyclin (Endkonzentration) inkubiert. Danach wurden die Luziferaseaktivität bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-68 gezeigt.

Ergebnisse

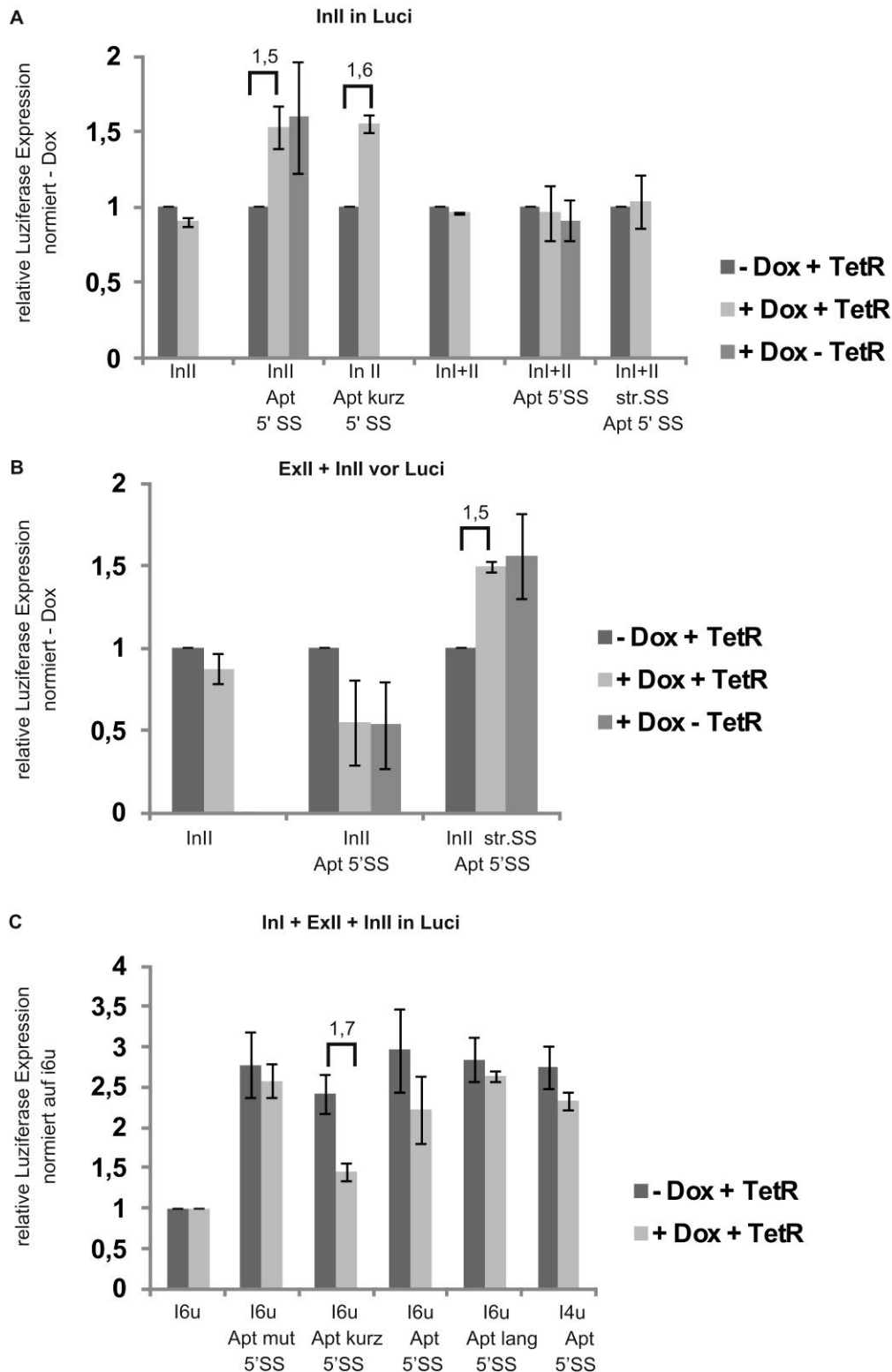


Abbildung 4-68: Luziferasemessungen für Luziferasekonstrukte mit TetR bindendem Aptamer (Apt). Das Aptamer liegt im Intron 2 und gemessen wurde in Ab- (-Dox +TetR, dunkelgrau) und Anwesenheit (+Dox + TetR, hellgrau) von 50 µM Doxycyclin (Dox) mit Kotransfektion von zweifachem Überschuss an TetR exprimierendem Vektor pWHE211_c-myc NLS-TetR. Als Kontrolle war teilweise Doxycyclin im Medium vorhanden aber es wurde kein TetR exprimierender Vektor kotransfiziert (+ Dox - TetR, mittelgrau). A: Hier sind die Konstrukte mit und ohne Aptamer mit dem Intron 2 bzw. Intron 1 und Intron 2 aus dem pMA-Minigen innerhalb des Luziferase-Gens gezeigt (InII in Luci, A in Abbildung 4-59). B: Hier sind die Konstrukte mit und ohne Aptamer mit dem Exon 2 und dem Intron 2 aus dem pMA-Minigen vor der Luziferase gezeigt (Ex II + In II vor Luci, B in Abbildung 4-59). C: Hier sind die Konstrukte mit dem Exon 2 und beiden flankierenden Introns innerhalb der Luziferase mit und ohne Aptamer dargestellt (InI + Ex II + In II in Luci, C in Abbildung 4-59). Es sind jeweils die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen mit Triplikaten und deren Standardabweichung als Fehlerbalken gezeigt.

Aus Abbildung 4-68 A ist ersichtlich, dass die Luziferasekonstrukte ohne Aptamer („InII“ und „InI + II“) nicht auf Doxycyclin reagierten, während das Konstrukt mit dem TetR bindenden Aptamer im Intron 2 („InII Apt 5' SS in Luci“) eine 1,5-fache Expressionssteigerung durch Doxycyclin zeigte. Durch das Ablösen des TetR-Proteins wird die Spleißstelle wieder frei und das Intron 2 kann raus gespleißt werden, wodurch weniger mRNAs mit einer Leserasterverschiebung vorliegen und demnach auch mehr aktive Luziferase exprimiert werden kann. Wurde dieses Konstrukt in Abwesenheit von TetR gemessen, zeigte es die gleiche Luziferaseaktivität wie in Anwesenheit von TetR und Doxycyclin. Durch das Kürzen des Aptamerstammes auf 7 bp („InII Apt kurz 5' SS in Luci“) wurde eine Regulationsfaktor von 1,6 erreicht. Die Luziferasekonstrukte, welche sowohl das Intron 1 als auch das Intron 2 beinhalteten und bei denen ein Aptamer im Intron 2 enthalten war („InI + InII Apt 5' SS und „InI+ InII str. SS Apt 5' SS in Luci“), zeigten keine Veränderung der Luziferaseaktivität in An- und Abwesenheit von Doxycyclin.

Für die Konstrukte mit dem Exon 2 und dem Intron 2 *upstream* des Luziferasegens (Abbildung 4-68 B, „Ex II + In II vor Luci“) zeigte sich ohne Aptamer („In II“ in Abbildung 4-68 B) kein Unterschied in der Luziferaseexpression in An- und Abwesenheit von Doxycyclin. Dies war auch für das Konstrukt mit Aptamer direkt *downstream* der 5'-Spleißstelle („Ex + InII + Apt 5' SS vor Luci“) der Fall. Nur das Konstrukt mit der starken Spleißstelle („Ex + InII str. SS Apt 5' SS vor Luci“) zeigte eine 1,5-fache Steigerung der Expression durch Zugabe von Doxycyclin. Hier lag das Expressionslevel der Luziferase in Abwesenheit von TetR auf der gleichen Höhe wie das in Anwesenheit von TetR und Doxycyclin.

Die Konstrukte mit dem Exon 2 und seinen flankierenden Introns innerhalb der Luziferase („In I + Ex II + In II in Luci“) zeigten ohne Aptamer („I6u“ in Abbildung 4-68 C) keine Aktivitätsänderung durch Zugabe von Doxycyclin. Da eine andere 5'-Spleißstelle als in den restlichen „I6u555“-Konstrukten enthalten war, zeigte es eine andere Expressionsrate als die Konstrukte mit Aptamer. Das Konstrukt mit dem TetR bindenden Aptamer mit dem 11 bp langen Stamm direkt *downstream* der 5'-Spleißstelle („In I + Ex II + In II TetR Apt 5' SS in Luci“, „I6u Apt 5' SS“ in Abbildung 4-68 C) zeigt eine geringfügig stärkere Luziferaseaktivität in Abwesenheit von Doxycyclin als in Anwesenheit. Hier wird durch Bindung des TetR-Proteins an das Aptamer die Spleißstelle unzugänglich und so kommt es zur Exklusion von Exon 2, was hier zu einer funktionalen Luziferase führt. Das Expressionslevel sinkt in Anwesenheit von Doxycyclin. Durch das Ablösen des TetR-Proteins vom Aptamer kommt es zur Inklusion des Exons 2 und somit zu einer Verschiebung des Leserasters und dem Absinken der Luziferaseaktivität.

Wurde der Stamm des Aptamers auf 7 bp gekürzt („In I + Ex II + In II TetR Apt kurz 5' SS in Luci“, „I6u Apt kurz 5' SS“ in Abbildung 4-68 C), stieg der Regulationsfaktor auf 1,7 an. Bei einer Verlängerung des Aptamerstammes auf 17 bp („In I + Ex II + In II TetR Apt lang 5' SS

in Luci“, „I6u Apt lang 5' SS“ in Abbildung 4-68 C) war keine Regulation mehr beobachtbar. Wurden in das Aptamer mit dem 11 bp langen Stamm zwei Punktmutationen eingeführt („In I + Ex II + In II TetR Apt mut 5' SS in Luci“, „I6u Apt mut 5' SS“ in Abbildung 4-68 C), welche die Wechselwirkung mit TetR verhindern, war keine Veränderung der Luziferaseaktivität in An- und Abwesenheit von Doxycyclin mehr beobachtbar. Des Weiteren wurde, wie schon im pMA-Minigen (Abbildung 4-41), eine schwächere 3'-Spleißstelle am Exon 2 getestet („In I + Ex II + In II TetR Apt i4u 5' SS in Luci“, „I4u Apt 5' SS“ in Abbildung 4-68 C). Hier zeigte sich nur eine geringe Reduktion der Luziferaseaktivität nach Zugabe von Doxycyclin.

4.3.5.4 Optimierung des Regulationseffekts durch Veränderung der Versuchsbedingungen

Für eine Verbesserung der Regulation sollten die Versuchsbedingungen optimiert werden. Die Inkubationszeit der Zellen nach der Transfektion wurde von 24 h auf 48 h verlängert. Des Weiteren wurde die Menge an TetR exprimierendem Plasmid erhöht. Hiermit sollte sichergestellt werden, dass genügend TetR exprimiert wird, damit alle Aptamere gebunden werden können. Es wurde neben einem zweifachen ein 20- bzw. 38-fachen Überschuss bezogen auf das Luziferase exprimierende Plasmid getestet. Die Luziferasemessungen sind in Abbildung 4-69 und Abbildung 4-70 gezeigt.

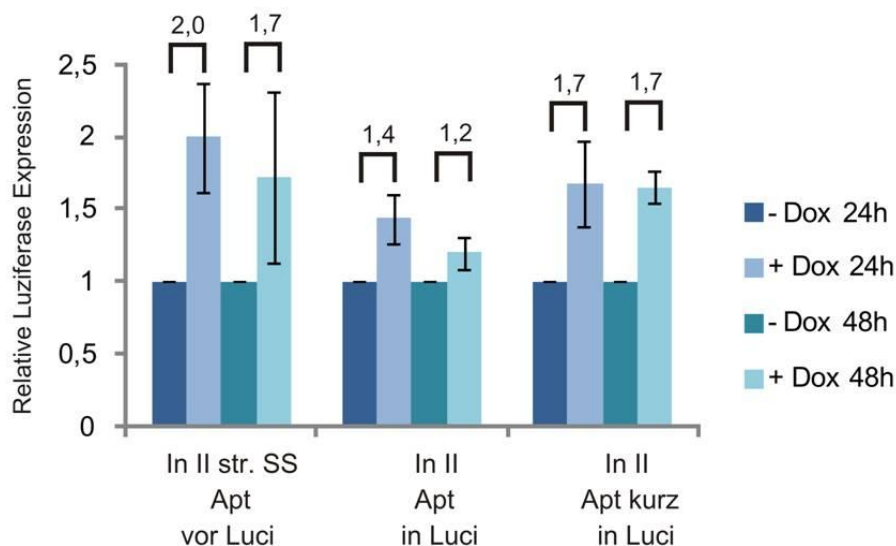


Abbildung 4-69: Luziferaseaktivität bei optimierten Inkubationszeiten für die Konstrukte, welche bereits in vorhergehenden Messungen (Abbildung 4-68) einen Regulationseffekt zeigten.

Gezeigt sind die Konstrukte „Ex II + In II str. SS + TetR Apt 5' SS vor Luci“ (In II str. SS Apt vor Luci), „In II + TetR Apt 5' SS vor Luci“ (In II Apt in Luci) und „In II + TetR Apt kurz 5' SS in Luci“. Hier wurden die Zellen nach der Transfektion für 24 h (blau) bzw. 48 h (türkis) inkubiert. Die Zellen wurden jeweils in Ab- (dunkel) und Anwesenheit (hell) von 50 µM Doxycyclin nach der Kotretransfektion des Luziferasevektors und einem 20-fachen Überschuss an TetR exprimierendem Plasmid pWHE211_c-myc-NLS-TetR inkubiert. Es sind die Mittelwerte aus mind. zwei unabhängigen Messungen mit Triplikaten und deren Standardabweichung als Fehlerbalken gezeigt.

Für alle drei getestete Konstrukte konnte keine signifikanten Änderungen in der Luziferaseexpression durch eine längere Inkubation festgestellt werden. Demnach wurde die Inkubationsdauer von 24 h beibehalten.

Ergebnisse

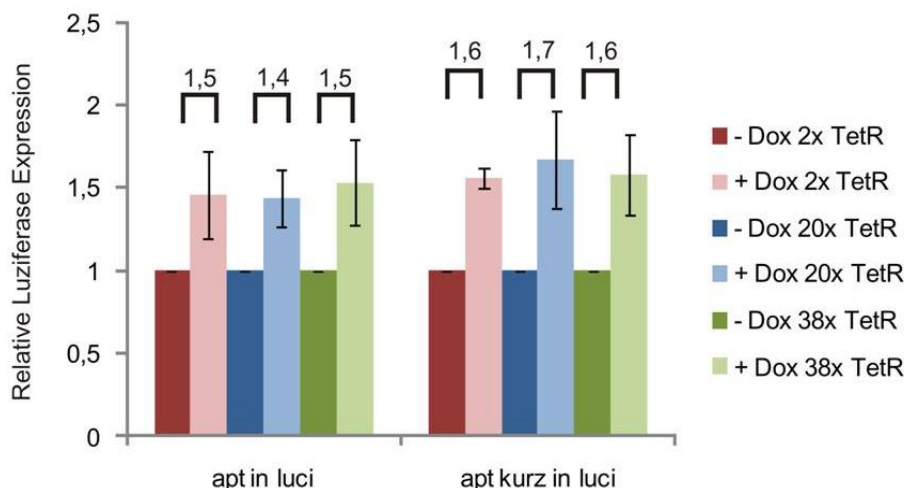


Abbildung 4-70: Luziferaseaktivität bei optimierten TetR-Mengen für die Konstrukte, welche bereits in vorhergehenden Messungen (Abbildung 4-68) einen Regulationseffekt zeigten.

Gezeigt sind die Konstrukte „In II + TetR Apt 5' SS in Luci“ (apt in luci) und „In II + TetR Apt kurz 5' SS in Luci“ (apt kurz in luci). Hier wurde der TetR exprimierendem Vektor pWHE211_c-myc NLS-TetR in zweifachem (rot), 20-fachem (blau) bzw. 38-fachem (grün) Überschuss zum Luziferase exprimierenden Vektor mit Aptamer kotransfiziert und 24 h inkubiert vor der Luziferaseaktivitätsbestimmung. Es sind die Mittelwerte aus mind. zwei unabhängigen Messungen mit Triplikaten und deren Standardabweichung als Fehlerbalken gezeigt.

Auch durch die Variation der TetR-Menge konnte keine signifikante Verbesserung erzielt werden. Um jedoch mit TetR definitiv im Überschuss zu liegen, wurde für die folgenden Versuche ein 20-facher Überschuss an TetR exprimierendem Plasmid verwendet.

4.3.5.5 Optimierung des Effekts durch neue Konstrukte

Ein weiterer Ansatz für die Verbesserung des beobachteten Regulation war die Optimierung der Konstrukte. Die neuen Konstrukte basieren auf der Beobachtung, dass die starke Spleißstelle mit dem TetR bindenden Aptamer 12_1 R und das destabilisierte TetR bindenden Aptamer mit dem kurzen 7 bp langen Stamm eine gute Regulation zeigten (Abbildung 4-68; „In II + Apt kurz 5' SS in Luci“ und „In II str. SS + Apt vor Luci“). Demnach wurde die starke Spleißstelle in das Konstrukt mit dem kurzen Aptamer im Intron 2 innerhalb der Luziferase inseriert („InII strong SS + Tet Apt kurz 5' SS in Luci“, Abbildung 4-71 A).

Da das Luziferasekonstrukt mit dem Intron 2 innerhalb des *luc* Gens eine höhere Luziferaseaktivität zeigte als das Konstrukt mit Exon 2 und Intron 2 vor der Luziferase (Abbildung 4-67), wurden weitere Konstrukte in dem „InII in Luci“-System entwickelt.

Da der Regulationsfaktor mit dem Kürzen des Aptamers in diesem System steigt, wurden in einem neuen Konstrukt der Aptamerstamm um ein weiteres Nukleotid gekürzt („InII + Tet Apt sehr kurz 5' SS in Luci“, Abbildung 4-71 B). Dieses sehr kurze Aptamer wurde ebenfalls zusätzlich mit der starken 5'-Spleißstelle kombiniert („In II strong SS + Tet Apt sehr kurz 5' SS in Luci“, Abbildung 4-71 B). In einem weiteren Ansatz wurde die Position des kurzen TetR bindende Aptamers mit dem 7 bp langen Stamm verändert. Zum einen wurde das Aptamer zwei Nukleotide *downstream* der 5'-Spleißstelle inseriert („InII + Tet Apt kurz hinter 5' SS in Luci“, Abbildung 4-71 C). In einem weiteren Konstrukt wurde die 5'-Spleißstelle mit

Ergebnisse

zwei Nukleotiden in den Aptamerstamm integriert („InII + Tet Apt kurz in 5' SS in Luci“, Abbildung 4-71 D). Die neuen Konstrukte sind in Abbildung 4-71 gezeigt.

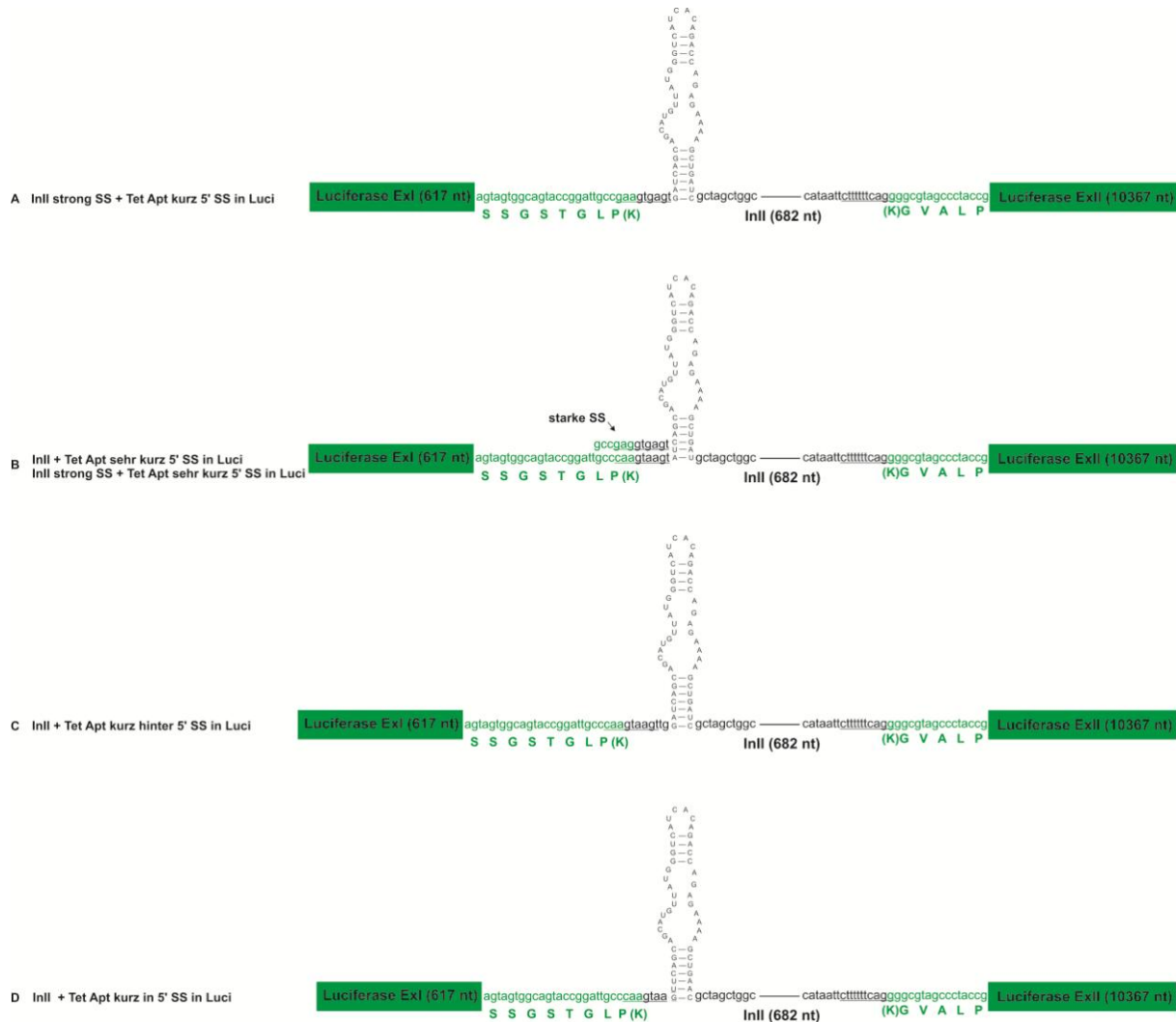


Abbildung 4-71: Schematische Darstellung der neuen Konstrukte.

A: In diesem Konstrukt wurde die starke 5'-Spleißstelle 5' des destabilisierten Aptamers mit einem 7 bp langen Stamm im Konstrukt mit dem Intron 2 aus dem pMA-Minigen innerhalb der Luziferase eingefügt (InII strong SS + Tet Apt kurz 5' SS in Luci). **B:** Für diese Konstrukte wurde der Stamm des Aptamers auf 6 bp gekürzt und dieses hinter der 5'-Spleißstelle aus dem pMA-Minigen (InII + Tet Apt sehr kurz 5' SS in Luci) und hinter der starken 5'-Spleißstelle (InII strong SS + Tet Apt sehr kurz 5' SS in Luci) im Intron 2 innerhalb der Luziferase inseriert. **C:** Hier wurde das TetR bindende Aptamer mit dem 7 bp langen Stamm zwei Nukleotide 3' der 5'-Spleißstelle im Intron 2 innerhalb der Luziferase inseriert (InII + Tet Apt kurz hinter 5' SS in Luci). **D:** Im letzten Konstrukt wurde die 5'-Spleißstelle mit zwei Nukleotiden in den Stamm des TetR bindenden Aptamers integriert (InII + Tet Apt kurz in 5' SS in Luci).

4.3.5.5.1 Klonierung des destabilisiertem TetR Aptamer in Intron 2 in Firefly Luziferase

Für die Klonierung der neuen Konstrukte wurden PCR-Reaktionen mit den in Tabelle 4-5 aufgeführten Oligonukleotiden und dem Vektor pGL4.10_CMV InII + TetR Apt 5'SS in luci durchgeführt.

Tabelle 4-5: Verwendete Primerpaare für die PCR zur Klonierung der aufgeführten Konstrukte

Konstrukt	Primerpaar für PCR
In II strong SS + Tet Apt kurz 5' SS in Luci	Fwd_pGL4 vor ATG Rev_pGL4 ExII UH TetR Apt kurz strong 5ss & Fwd_pMA InII UH TetR Apt kurz Rev_pGL4 intron II (UH ExIII)
In II strong SS + Tet Apt sehr kurz 5' SS in Luci	Fwd_pGL4 vor ATG Rev_pGL4 ExII UH TetR Apt sehr kurz strong 5ss & Fwd_pMA InII UH TetR Apt sehr kurz Rev_pGL4 intron II (UH ExIII)
In II + Tet Apt kurz 5' SS in Luci	Fwd_pGL4 vor ATG Rev_pGL4 ExII UH TetR Apt sehr kurz & Fwd_pMA InII UH TetR Apt sehr kurz Rev_pGL4 intron II (UH ExIII)
In II + Tet Apt kurz in 5' SS in Luci	Fwd_pGL4 vor ATG Rev_pGL4 ExII UH TetR Apt kurz in SS & Fwd_pMA InII UH TetR Apt kurz in SS Rev_pGL4 intron II (UH ExIII)
In II + Tet Apt kurz hinter 5' SS in Luci	Fwd_pGL4 vor ATG Rev_pGL4 ExII UH TetR Apt kurz hinter ss & Fwd_pMA InII UH TetR Apt kurz Rev_pGL4 intron II (UH ExIII)

Die um 15 bp überlappenden PCR-Fragmente wurden über eine *overlap* PCR mit den Oligonukleotiden Fwd_pGL4 vor ATG und Rev_pGL4 intron II (UH ExIII) zusammengeführt. Die PCR-Fragmente und der Vektor pGL4.10_CMV InII + TetR Apt 5'SS in luci wurden mit den Restriktionsenzymen ApaI und EcoRI geschnitten und ligiert. *E. coli* Top 10 wurde mit dem Ligationsansatz transformiert. Die Insertion der Aptamere in der gewünschten Orientierung sowie der Ausschluss von Sekundärmutationen wurden mittels Sequenzierung mit dem Oligonukleotid Fwd_pGL4 vor ATG bestätigt. Stellvertretend für die erhaltenen Vektoren ist Abbildung 4-72 pGL4.10_CMV InII + TetR Apt kurz in Luci dargestellt.

Ergebnisse

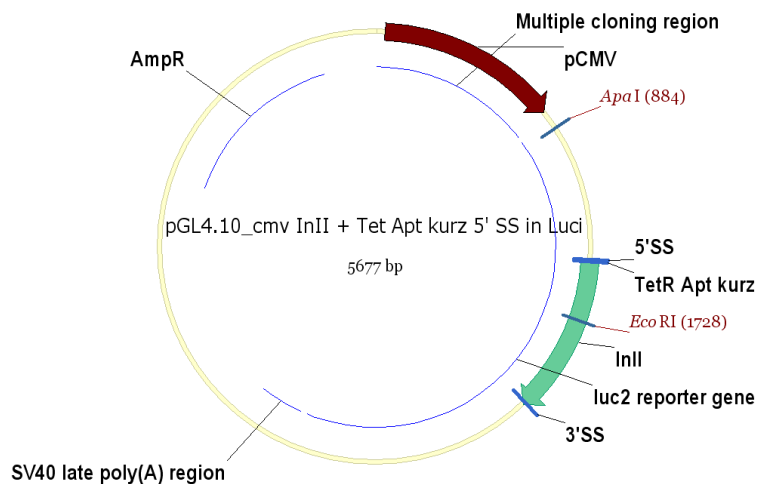


Abbildung 4-72: Vektorkarte für pGL4.10_CMV In II + Tet Apt kurz 5' SS in Luci.

Der Vektor codiert für die Firefly Luziferase (luc2 reporter gene), in welche Intron 2 und das TetR bindende Aptamer (TetR Apt kurz) mit einem 7 bp langen Stamm inseriert wurde, kontrolliert durch einen CMV-Promotor und enthält eine Ampicillinresistenz (AmpR). Gene und funktionale Elemente sind als Pfeile dargestellt.

4.3.5.5.2 Analyse der Luziferaseexpression der neuen Konstrukte

HEK293-Zellen wurden mit den neuen Konstrukte zusammen mit einem 20-fachen Überschuss an TetR exprimierendem Plasmid und dem *Renilla* Luziferase exprimierenden Plasmid als Transfektionskontrolle transfiziert und 24 h in An- und Abwesenheit von 50 μ M Doxycyclin im Medium inkubiert, bevor die Luziferaseaktivität bestimmt wurde. Das Ergebnis der Messungen ist in Abbildung 4-73 gezeigt.

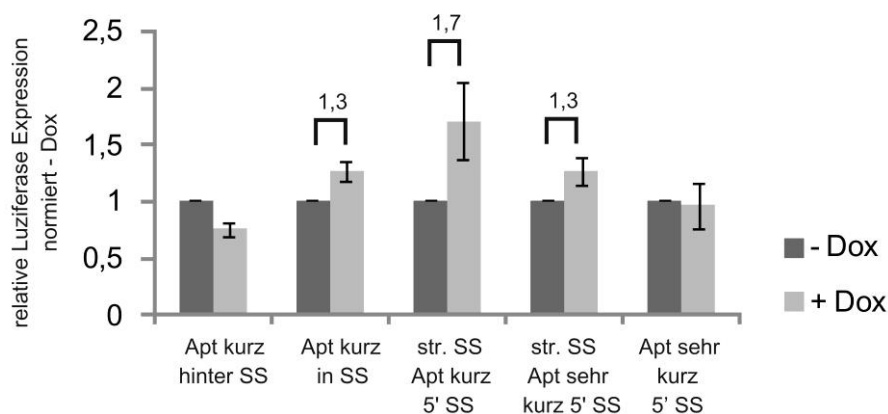


Abbildung 4-73: Luziferaseaktivität für optimierte Versuchsbedingungen für die neuen Konstrukte mit dem Intron 2 innerhalb der Luziferase (Abbildung 4-71).

Gezeigt sind von links nach rechts die Konstrukte „In II + Tet Apt kurz hinter 5' SS in Luci“ (Apt kurz hinter SS), „In II + Tet Apt kurz in 5' SS in Luci“ (Apt kurz in SS), „In II strong SS + Tet Apt kurz 5' SS in Luci“ (str. SS Apt kurz 5' SS), „In II strong SS + Tet Apt sehr kurz 5' SS in Luci“ (str. SS Apt sehr kurz 5' SS) und „In II + Tet Apt kurz 5' SS in Luci“ (Apt sehr kurz 5' SS).

Der TetR exprimierendem Vektor pWHE211_c-myc NLS-TetR wurde in 20-fachem Überschuss zum Luziferase exprimierenden Vektor mit Aptamer kotransfiziert und 24 h in Ab- (- Dox) und Anwesenheit (+ Dox) von 50 μ M Doxycyclin inkubiert vor der Luziferaseaktivitätsbestimmung. Hier sind die Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Messungen mit Triplikaten und deren Standardabweichung als Fehlerbalken gezeigt.

Es zeigte sich, dass das Konstrukt mit dem kurzen TetR bindenden Aptamer mit einem 7 bp langen Stamm 2 nt *downstream* der 5'-Spleißstelle („Apt kurz hinter SS“) und das Aptamer mit dem sehr kurzen, 6 bp langen, Stamm direkt *downstream* der 5'-Spleißstelle („Apt sehr

kurz 5' SS“) keine Unterschiede in der Luziferaseexpression in An- und Abwesenheit von Doxycyclin zeigten. Das Aptamer mit dem kurzen, 7 bp langen Stamm, bei dem 2 nt der 5'-Spleißstelle in den Aptamerstamm inseriert waren („Apt kurz in SS“), zeigte eine 1,3-fache Steigerung der Luziferaseexpression in Anwesenheit von Doxycyclin. Den gleichen Regulationsfaktor wies das Aptamer mit dem sehr kurzen, 6 bp langen Stamm, direkt *downstream* der starken 5'-Spleißstelle („str. SS Apt sehr kurz 5' SS“) auf. Den stärksten Regulationsfaktor von 1,7 zeigt das Aptamer mit dem 7 bp langen Stamm und der starken 5'-Spleißstelle („str. SS Apt kurz 5' SS“).

4.3.5.5.3 Transfektion in tetrazyklinfreiem FBS

Viele Bauern füttern ihren Rindern tetrazyklinhaltiges Futter, weshalb das fötale Rinderserum (FBS), welches als Medienzusatz in der Zellkultur eingesetzt wird, oft Spuren von Tetrazyklin enthält. Der natürliche Ligand von TetR ist Tetrazyklin. Deshalb besteht die Möglichkeit, dass TetR statt an das in die Zellen transfizierte Aptamerkonstrukt an das im Medium enthaltene Tetrazyklin bindet und somit der Regulationsfaktor abgesenkt wird. Um dies auszuschließen, wurden HEK293-Zellen in Medium mit FBS angezogen, welches nach Herstellerangaben „tetrazyklinfrei“ war. Für diese Messung wurden die vielversprechendsten Konstrukte „InI + ExII + InII Apt kurz 5' SS in Luci“, „InII Apt kurz 5' SS in Luci“ und „In II str. SS Apt kurz 5' SS in Luci“ mit dem stärksten Regulationsfaktor von 1,7 eingesetzt. Diese Zellen wurden wie in Kap. 4.3.5.5.2 beschrieben transfiziert, mit und ohne 50 µM Doxycyclin inkubiert und die Luziferaseaktivität gemessen. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-74 dargestellt.

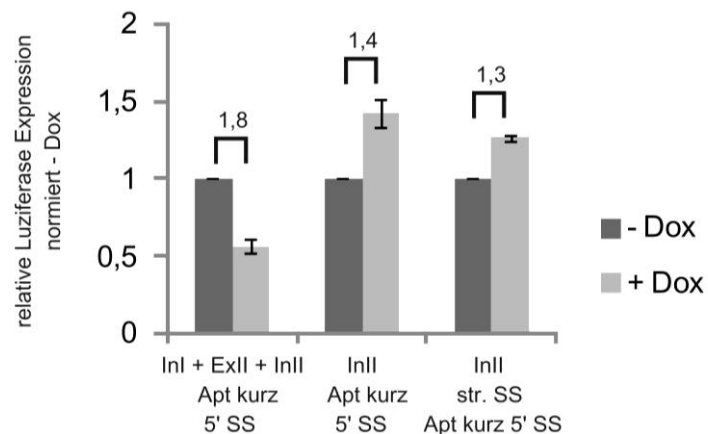


Abbildung 4-74: Luziferaseaktivität für die vielversprechendsten Konstrukte in tetrazyklinfreiem Medium. Der TetR exprimierendem Vektor pWHE211_c-myc NLS-TetR wurde in 20-fachem Überschuss zum Luziferase exprimierenden Vektor mit Aptamer kotransfiziert und 24 h in Ab- (- Dox) und Anwesenheit (+ Dox) von 50 µM Doxycyclin inkubiert vor der Luziferaseaktivitätsbestimmung. Hier sind die Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Messungen mit Triplikaten und deren Standardabweichung als Fehlerbalken gezeigt.

Es zeigte sich, dass die HEK293-Zellen in dem Medium mit tetrazyklinfreiem FBS wesentlich langsamer wuchsen. Für das Konstrukt mit dem Exon 2 und den flankierenden Introns aus dem pMA-Minigen innerhalb der Luziferase mit dem Aptamer mit dem kurzen Stamm direkt *downstream* der 5'-Spleißstelle („InI + ExII + InII Apt kurz 5' SS in Luci“) konnte ein

Regulationsfaktor von 1,8 bestimmt werden. Für das Konstrukt mit dem Intron 2 innerhalb der Luziferase und dem kurzen Aptamer direkt *downstream* der 5'-Spleißstelle („InII Apt kurz 5' SS in Luci“) stieg die Luziferaseexpression auf das 1,4-fache an in Anwesenheit von Doxycyclin. Ein 1,3-facher Anstieg war für das Konstrukt mit dem Intron 2 innerhalb der Luziferase und dem kurzen TetR bindenden Aptamer direkt *downstream* der starken 5'-Spleißstelle („In II str. SS Apt kurz 5' SS in Luci“) messbar.

Insgesamt hat der Wechsel zu tetrazyklinfreiem FBS auf Grund des schlechten Zellwachstums keinen Einfluss auf die Regulationsfaktoren der Konstrukte gehabt.

4.3.5.6 Analyse der RNA-Menge mittels qRT-PCR

Da bisher nur das Expressionslevel der Luziferase analysiert wurde, sollte die mRNA-Menge bestimmt werden, um unspezifische Transkriptionseffekte auszuschließen.

Dazu wurden HEK293-Zellen mit den Konstrukten mit dem Intron 2 innerhalb der Luziferase und dem kurzen Aptamer mit zwei unterschiedlichen Spleißstellen („InII + Apt kurz 5' SS in Luci“ und „In II str. SS + Apt kurz in Luci“) transfiziert. Zusätzlich wurde ein 20-facher Überschuss an TetR exprimierendem Plasmid und das *Renilla* Luziferase exprimierende Plasmid kotransfiziert. Nach 24 h Inkubation in An- und Abwesenheit von 50 µM Doxycyclin wurde die RNA präpariert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert. Die verwendeten Oligonukleotide binden beide hinter dem Intron 2 und diskriminieren somit nicht zwischen gespleißter und ungespleißter mRNA. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-75 gezeigt.

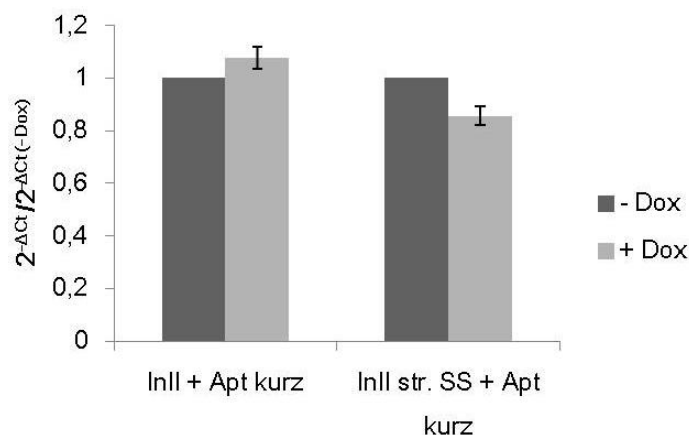


Abbildung 4-75: qRT-PCR Daten für die Analyse der mRNA-Menge der Luziferase.

Gezeigt sind die Konstrukte „In II + TetR Apt kurz 5' SS in Luci“ (InII + Apt kurz) und „In II strong SS + TetR Apt kurz 5' SS in Luci“ (In II str. SS + Apt kurz). Der TetR exprimierendem Vektor pWHE211_c-myc NLS-TetR wurde in 20-fachem Überschuss zum Luziferase exprimierenden Vektor kotransfiziert. Die Zellen wurden 24 h in Ab- (- Dox) und Anwesenheit (+ Dox) von 50 µM Doxycyclin inkubiert, die RNA der präpariert, in cDNA umgeschrieben und mit einer qRT-PCR analysiert. Die Ct-Werte der *Renilla* Luziferase wurden von den Ct-Werten der Firefly Luziferase subtrahiert und der ΔC_t -Wert in die Potenz genommen und auf den Wert der Messung ohne Doxycyclin normiert. Hier sind die Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Messungen mit Triplikaten und deren Standardabweichung als Fehlerbalken gezeigt.

Es zeigte sich, dass sowohl für das Konstrukt „InII + Apt kurz 5' SS in Luci“ („In II + Apt kurz“ in Abbildung 4-75) mit dem Aptamer mit dem kurzen Stamm als auch für das Konstrukt mit der starken Spleißstelle („InII str. SS + Apt kurz 5' SS in Luci“, „In II str. SS + Apt kurz“ in Abbildung 4-75) kein Unterschied in der RNA-Menge beobachtbar war.

5 Diskussion

5.1 Bindung von Rec an RcRE pck30

Das RcRE ist eine stark strukturierte Region im 5'-LTR der viralen RNA von HERV-K. Die Bindung des Rec-Proteins an dieses RNA-Element vermittelt den Export gespleißter und ungespleißter viraler RNA aus dem Zellkern. Über chemische Interferenzstudien konnte gezeigt werden, dass purinreiche Motive an der Bindung beteiligt sind.¹¹³ In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der prognostizierten, purinreichen Sequenzen für die Rec-Bindung untersucht. Hierzu wurde die Bindung von Rec an kleine RNA-Haarnadelstrukturen, welche die verschiedenen Bindemotive in ihrer terminalen Schleife präsentieren, untersucht. Hierbei zeigten alle purinreichen Haarnadelstrukturen eine Bindung, die pyrimidinhaltige Kontrolle dagegen nicht. Das GGAA-Motiv, welches zweimal in RcRE pck30 vorkommt, zeigte die stärkste Verzögerung.

Interessanterweise wiesen die Haarnadelstrukturen einen K_D im μM -Bereich auf, wohingegen das komplette RcRE pck30 Rec mit einem K_D von 45 nM bindet. Die Rec-Bindung an die Haarnadelstrukturen ist somit um ein 50-faches schlechter. Es scheinen demnach nicht ausschließlich die Bindemotive für die Bindung an Rec wichtig zu sein, sondern die komplette Struktur des RcRE pck30. Dies wird auch durch die Gelverzögerungsexperimente mit den mutierten RcREs unterstützt. Hier zeigte sich, dass alle Mutationen die Bindung verschlechtern, die mutierten RcREs aber alle im nM-Bereich gebunden werden. Die stärkste Auswirkung auf die Bindung hatten die Mutationen M3 und M5, welche im zentralen Bereich der Struktur liegen. Ein Fit der Bindung war nur mit der Hillfunktion möglich, was auf eine kooperative Bindung schließen lässt.

Da die Haarnadelstrukturen wesentlich schlechter gebunden wurden und die Mutationen nur einen geringen Einfluss auf die Bindung zeigten, wird vermutet, dass vor allem die Struktur für die Bindung von Rec an das RcRE pck30 wichtig ist und die purinreichen Sequenzen nur eine unterstützende Wirkung haben.

Auch in den Exportstudien zeigten alle Mutationen einen negativen Effekt, vor allem die zentral in der Struktur gelegenen Motive. Den stärksten Effekt hatte die Dreifachmutation. Insgesamt wurden aber auch hier alle Mutanten von Rec gebunden und exportiert, was darauf hinweist, dass die purinreichen Sequenzen nicht die einzigen Erkennungsstellen für Rec sind.

Die Effekte der Mutation auf den Export scheinen stärker zu sein als auf die Bindung von Rec an das RcRE pck30. Daher wird angenommen, dass die Mutationen den Exportkomplex mit Rec destabilisieren und die purinreichen Motive möglicherweise für die Ausbildung eines stabilen Exportkomplexes wichtig sein könnten.

5.1.1 Bindungsmodell von Rev

Rev ist das funktionelle Analog von Rec bei HIV.¹⁰⁰ Im Gegensatz zu Rec bindet Rev bevorzugt an ein definiertes Element innerhalb seines responsiven Elements RRE, die Stammschleife IIB. Wenn die Stammschleife IIB entfernt wird, ist keine Bindung von Rev mehr an die RRE beobachtbar. Wird die Stammschleife allerdings durch eine andere Sequenz mit der gleichen Sekundärstruktur ersetzt, bindet Rev. Demnach erkennt Rev nur die Struktur seines RRE und keine Sequenzelemente.¹²⁷ Der Export des RcRE pck30 ist ebenfalls inhibiert, wenn die Struktur zerstört wird.¹¹²

Durch Kristallisation konnte gezeigt werden, dass Rev mit drei Dimeren an sein responsives RNA-Element RRE bindet. Hierbei bindet Rev sequentiell zuerst an einer hoch affinen Bindestelle und danach erfolgt die Bindung von weiteren Dimeren an bereits gebundene Rev-Proteine und benachbarte Bindestellen auf der RNA mit geringerer Affinität.¹²⁸ Dieses Bindungsmodell ist in Abbildung 5-1 dargestellt.

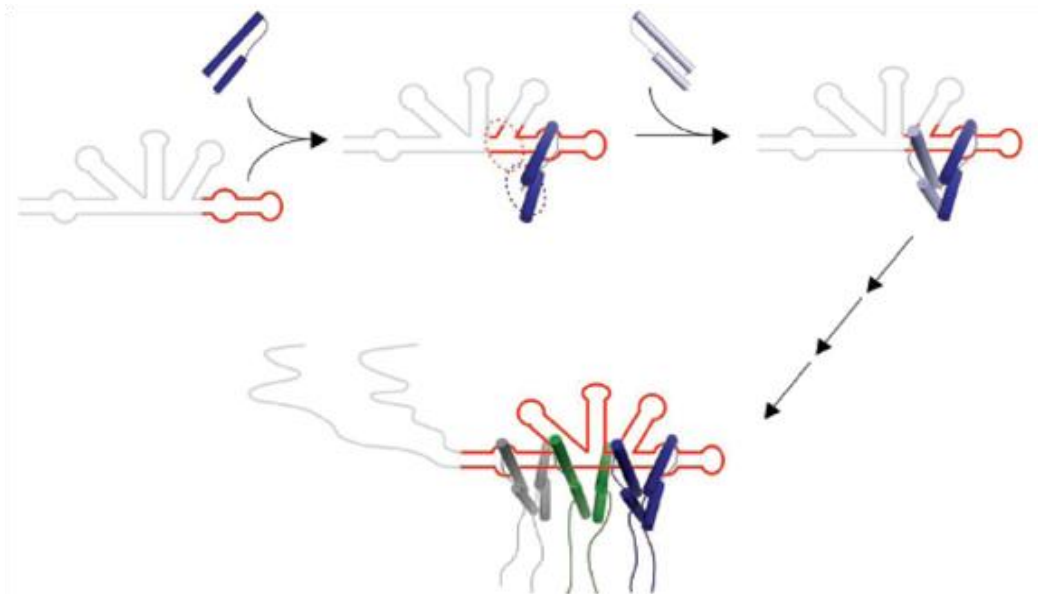


Abbildung 5-1: Schematische Darstellung des Bindemotivs von Rev.

Zuerst erfolgt die Bindung eines Rev-Proteins an eine hochaffine Bindestelle, wodurch weitere Rev-Proteine an weniger affine Bindestellen rekrutiert werden, sodass letztendlich drei Rev-Dimere an ein RRE binden. Entnommen aus Daugherty *et al.*¹²⁸.

Ein vergleichbares Bindungsmodell ist auch für Rec vorstellbar. Mit LILBID Massenspektrometrie konnte bereits gezeigt werden, dass Rec stabile Tetramere bildet und bis zu drei davon an eine RNA binden. Durch die Bindung an das RcRE pck30 konnten die Tetramere nicht mehr so leicht aufgelöst werden, wie wenn sie nicht an die RNA gebunden waren.¹¹³ Daher wird vermutet, dass die Bindung der RNA bei Rec eine Konformationsänderung induziert, welche die Interaktion zwischen den Untereinheiten verstärkt. Auch für Rev konnte gezeigt werden, dass das RRE den oligomeren Status von Rev kontrolliert.¹²⁹

Hieraus wurde nun ein Bindungsmodell für Rec entwickelt, wonach Rec in erster Linie an die zentrale Region der komplex gefalteten Struktur des RcRE pck30 bindet. Hierbei liegt nahe, dass diese Bindung durch die Bindung von Rec an purinreiche Motive, vor allem die zentralen GGAA-Sequenzen, in einzelsträngigen Regionen stabilisiert wird. In weiteren Schritten erfolgt dann die kooperative Bindung von weiteren Rec-Tetrameren an weniger affine Bindestellen, wie z. B. die GGAA- und AAGG-Motive, die weniger zentral in der Struktur liegen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Rec nicht allein an die purinreichen Motive innerhalb des RcRE pck30 bindet, sondern vor allem die komplex gefaltete Sekundärstruktur seines responsiven Elements erkennt und die GGAA- und AAGG-Motive zur Stabilisation der Bindung und des Exportkomplexes beitragen.

5.2 Replikationsregulation von SFV

In dieser Arbeit wurden zwei Ansätze zur Replikationsregulation von SFV verfolgt. Zum einen wurde das Tetrazyklin bindende Aptamer im Bereich des subgenomischen Promotors inseriert. Über das Aptamer sollte hier den Zugang zum Promotor bzw. zum Startcodon kontrolliert werden. In einem weiteren Ansatz wurde das Theophyllin abhängige *hammerhead* Ribozym in den 3'-UTR eingefügt, welches durch Selbstspaltung den PolyA-Schwanz entfernen sollte und so die virale RNA für die Degradation durch die Wirtszelle freigibt.

5.2.1 Replikationsregulation durch das Tetrazyklin bindende Aptamer

Es wurden mehrere Aptamerpositionen innerhalb des subgenomischen Promotors untersucht. Es zeigte sich, dass die Expression viraler Gene allein durch die Insertion des Aptamers vor der konservierten Sequenz „AGAGGA“ oder durch zwei Aptamere vor dem Startcodon stark inhibiert wird. Eine Beeinträchtigung zellulärer Funktionen durch ein inseriertes Aptamer (schon in Abwesenheit des Liganden) war von früheren Arbeiten zur Translationskontrolle in Hefen bekannt.²⁷ Auch der Virus ist sehr anfällig für Sekundärstrukturen innerhalb des subgenomischen Promotors.

Keiner der analysierten Konstrukte führte zu einer signifikanten Kontrolle durch das Aptamer. Ein Schalter („Tc vor AUG“) zeigte im Westernblot geringe Effekte, bei der Analyse der GFP-Fluoreszenz unter optimierten Versuchsbedingungen konnte die Regulation jedoch nicht mehr beobachtet werden. Dieser Schalter liegt vor dem Startcodon und blockiert möglicherweise nicht die Replikation sondern die Translation der subgenomischen mRNA. Allerdings wird die Replikation durch die Translationskontrolle essentieller Gene ebenfalls beeinflusst. Es zeigte sich, dass die GFP-Expression bei dem Konstrukt mit Aptamer schwächer war als bei dem ohne. Dies deutet darauf hin, dass das bereits ohne Ligand

vorgeformte Tetrazyklin bindende Aptamer den Zugang zum Startcodon inhibiert. Diese Inhibition konnte durch die Stabilisation der Aptamerstruktur bei Ligandbindung jedoch nicht weiter verstärkt werden. Demnach scheint SFV im Bereich des subgenomischen Promotors an bestimmten Stellen sehr anfällig für Sekundärstrukturen zu sein und an anderen Stellen können Sekundärstrukturen relativ problemlos überlesen werden. Dies erschwert eine Regulation über das vorgeformte Tetrazyklin bindende Aptamer im Bereich des subgenomischen Promotors enorm.

5.2.2 Replikationsregulation durch das Theophyllin abhängige hammerhead Ribozym

Das Theophyllin abhängige *hammerhead* Ribozym wurde bereits in humanen Zellen zur Kontrolle der Genexpression eingesetzt und erzielte bei einer Theophyllinkonzentration von 2,5 mM eine Absenkung der Expression auf 30%.⁵⁶ Da Theophyllin jedoch für viele Zellen toxisch ist, wurde in dieser Arbeit zuerst die Zellviabilität der verwendeten Hamsterzellen mit Theophyllin untersucht. Es zeigte sich, dass bereits bei 1 mM nur noch 40% der Zellen metabolische Aktivität aufwiesen. Um dieses Problem zu umgehen wurden Mosquitozellen auf ihre Theophyllintoleranz untersucht. Diese zeigten eine bessere Verträglichkeit, da hier bei 10 mM Theophyllin noch 40% der Zellen metabolisch aktiv waren.

Das Theophyllin abhängige *hammerhead* Ribozym wurde im 3'-UTR des SFV-Genoms inseriert. Als Kontrolle wurde ein mutiertes *hammerhead* mitgeführt, das nicht mehr in der Lage war sich selbst zu spalten. Bei einer Inkubation von 48 h war die Fluoreszenz der beiden Konstrukte vergleichbar. Für das aktive Theophyllin abhängige *hammerhead* konnte keine Expressionsregulation beobachtet werden. Die Aktivität des Theophyllin abhängigen *hammerhead* Ribozyms konnte jedoch in diesem Kontext nicht überprüft werden, da das Virusgenom im VRP mit der Hüllmembran verankert ist und virale Proteine daran gebunden sind, was die Faltung beeinflussen kann. Somit ist es möglich, dass sich das Ribozym aufgrund der umgebenden Sequenz oder einer Beeinflussung durch unspezifische bindende Proteine nicht richtig faltet und daher nicht aktiv ist. Eine solche Falschfaltung konnte bereits *in vitro* für ein *hammerhead* beobachtet werden, was mit dem Tetrazyklin bindenden Aptamer fusioniert wurde.¹³⁰

Des Weiteren war der dynamische Bereich der Regulation dieses Ribozymes mit einer Genrepression auf 30% nicht sehr hoch.⁵⁶ Eine Regulation der Replikation unter diesen Bedingungen mit dem Theophyllin abhängigen *hammerhead* Ribozym ist somit eventuell nicht möglich und sollte wiederholt werden, wenn es ein Ribozym mit besseren regulatorischen Eigenschaften gibt.

5.2.3 Vergleich des Regulationsansatzes zur Replikationsregulation

In dieser Arbeit wurde auf die in der Translationsregulation bewährte Methode der Zugangsregulation durch Aptamere zurückgegriffen.^{22, 28, 29, 33, 48, 131} Dies war beim SFV allerdings nicht erfolgreich. Es war bereits eine Studie bekannt, in der erfolgreich ein Aptamer zur Regulation eines Pflanzenvirus eingesetzt wurde. Hier wurde eine essentielle Sekundärstruktur des Virus gegen ein Theophyllin bindendes Aptamer ausgetauscht.⁸¹ Eventuell ist ein ähnlicher Ansatz bei SFV auch denkbar. Allerdings ist die Sekundärstruktur des 3'- und 5'-UTRs bei SFV noch nicht aufgeklärt und essentielle Sekundärstrukturelemente sind noch nicht bekannt. Dadurch kann eine optimale Position des Aptamers nur sehr schwer bestimmt werden und ein Ausprobieren vieler verschiedener Konstrukte wäre notwendig. Demnach würde es sich empfehlen, einen besser charakterisierten Virus zur Regulation heranzuziehen. In dieser Arbeit sollte jedoch ein klinisch relevanter Plusstrang-RNA-Virus verwendet werden, was die Auswahl einschränkte.

Letztendlich ist die Regulation von SFV durch RNA-Schalter wahrscheinlich nicht unmöglich aber es müssten zuvor strukturelle Daten zu funktionell wichtigen Regionen erhoben werden, um die optimale Position für einen RNA-Schalter zu ermitteln.

5.3 Spleißregulation

5.3.1 Spleißregulation im pMA-Minigen

Spleißen ist in eukaryotischen Zellen ein hoch komplexer Vorgang, der sehr stark von verstärkenden und abschwächenden Faktoren beeinflusst wird. Deshalb wurde in dieser Arbeit zuerst mit in einem Minigenkontext gearbeitet, da hier eine Arbeit mit definierten Versuchsbedingungen möglich ist. Zur Regulation wurde ein Aptamer verwendet, das von dem Protein TetR gebunden wird. Die Bindung sollte mit dem Spleißprozess interferieren.

Bei den pMA-Minigenexperimenten zeigte sich, dass allein die Insertion des TetR bindenden Aptamers direkt *downstream* der 5'-Spleißstelle im Intron 2, unabhängig vom Exonaufbau und der 3'-Spleißstelle, bereits zu einer verstärkten Exklusion des Exon 2 führte. Durch Stabilisation des Aptamerstammes, wurde dieser Effekt verstärkt. Demnach scheint das Aptamer bereits ohne Ligand die 5'-Spleißstelle zu maskieren. Dies wurde bereits bei der Spleißregulation durch das das Bakteriophagenprotein MS2 bindende Aptamer beobachtet.⁶⁴ Die Umgebung der Spleißstellen ist sensitiv für Sekundärstrukturen, da diese die Bindung von *enhancer* und *silencer* Proteinen sowie Spleißfaktoren beeinflussen können, was zur Exklusion des Exons führt. Dies gilt vor allem für die Umgebung der 3'-Spleißstelle.¹³² Demnach sollte eine flexiblere Struktur, ermöglicht durch ein gekürztes Aptamer, einen schwächeren Einfluss auf die Exonexklusion haben. Dies konnte mit dem gekürzten Aptamer

(7 statt 11 bp langer Stamm) beobachtet werden. Hier ist der Anteil an Inklusion des Kassettenexons höher als bei dem längeren Aptamerkonstrukt.

Durch Binden von TetR konnte die Exklusion des Exon 2 in den Konstrukten von „pMA_i6u555“ verstärkt und durch Doxycyclinzugabe wieder abgeschwächt werden. Durch die Variation der 3'-Spleißstelle konnte dieser Effekt nicht verstärkt werden. Hier war durch die Insertion des Aptamers bereits die Inklusion inhibiert. Durch eine stärkere 5'-Spleißstelle konnte jedoch ein wesentlich stärkerer Regulationseffekt erreicht werden. Hier ist die Inklusionsrate des Aptamers so stark, dass selbst durch Abschwächung der Inklusion durch die Insertion des Aptamers noch Inklusion beobachtbar ist, die durch die Bindung von TetR komplett inhibiert werden kann.

Insgesamt zeigte das destabilisierte Aptamer im Minigen mit der 5'-Spleißstelle aus dem „i6u555-Minigen“ die stärkste Regulation.

Wahrscheinlich liegt diesem Effekt die sterische Hinderung des Zugangs zur Spleißstelle durch die stabilisierte Aptamerstruktur und das daran gebundene TetR-Dimer zugrunde. Die beobachtete Regulation konnte jedoch nicht durch Zugabe von größeren TetR-Fusionsproteinen verstärkt werden. Hier wurden Fusionsproteine von TetR mit CTCF und mit hnRNP A1 getestet. Bei hnRNP A1 handelt es sich um einen *silencer* des Spleißprozesses, der die Inklusion des Kassettenexons hemmen sollte. Demnach würde ein stärkerer Regulationseffekt durch die Bindung von TetR-hnRNP A1 erwartet. Da dies nicht der Fall war und die Inklusion in Anwesenheit von TetR-hnRNPA1 geringfügig stärker war als in Anwesenheit von TetR, wird vermutet, dass dieses Fusionsprotein nicht als *silencer* wirkt sondern ausschließlich die Spleißstelle maskiert.

Der Regulationseffekt war bei dem mutierten Aptamer, welches TetR nicht mehr binden kann, nicht mehr detektierbar. Dies zeigt, dass der beobachtete Effekt auf die Bindung von TetR an das Aptamer zurückzuführen ist. Die Exklusionsbanden waren hier jedoch schwächer als bei dem Wildtyp Aptamer in Anwesenheit von Doxycyclin. Dies ist möglicherweise auf Umfaltungen und Wechselwirkungen des Aptamers mit Sequenzen nahe der Spleißstelle zurückzuführen.

Mit einem vergleichbaren Ansatz konnte bereits durch das den Transkriptionsfaktor NF- κ B, das das Signalprotein β -Catenin und das MS2 bindende Aptamer das Spleißen reguliert werden. Hier wurde das Aptamer ebenfalls in einem Minigenkontext im Intron inseriert und die Exklusion des Kassettenexons untersucht. Die Detektion erfolgte hier über ein Stoppcodon im Kassettenexon, welches nur bei Exklusion die Expression des *downstream* liegenden Reportergens erlaubt. Es wurde eine 45%ige Steigerung der Reportergenexpression durch den Aptamerliganden erreicht.⁶⁴

In dieser Arbeit konnten die Gele zur Analyse des Spleißmusters des Minigens nicht quantifiziert werden, daher kann die Effizienz der Regulation nur abgeschätzt werden. Für

das gekürzte Aptamer oder die starke Spleißstelle liegt die Exklusionsregulation jedoch oberhalb von 45%.

Des Weiteren wurde die Bindung des reversen TetR an das Konstrukt untersucht. Es wurde bereits eine Studie publiziert in welcher der reverse TetR durch die Bindung an das TetR bindende Aptamer die Translation geringfügig reguliert.⁴⁸ In der Publikation wurde die reverse TetR-Variante S2 verwendet, während in dieser Arbeit sM2 verwendet wurde.^{43, 48} Die beiden reversen TetR-Varianten unterscheiden sich durch die Mutation S¹²G, welche keinen Einfluss auf die Aptamerbindung haben sollte.⁴³ Es sind keine Studien bekannt, welche die Wechselwirkung des reversen TetR mit dem TetR bindenden Aptamer charakterisieren. Es wurden verschiedene Parameter optimiert, jedoch war unter keiner Bedingung ein Effekt zu beobachten, was die Vermutung nahe legt, dass diese reverse TetR-Variante nicht stabil an das Aptamer bindet.

5.3.2 Spleißregulation im GFP-Minigen

Ein weiteres Minigen wurde verwendet um zu überprüfen, wie universell einsetzbar der TetR-Aptamer-Schalter ist. In diesem Minigen gestaltete sich die Wahl der Oligonukleotide für die PCR zur Analyse des Spleißmusters schwierig, da bei 25 getesteten Kombinationen zusätzliche Banden auftraten.

Für das Konstrukt mit dem Aptamer im Exon 2 konnte eine TetR abhängige Exklusion des Exon 2 beobachtet werden. Allerdings konnte das ursprüngliche Inklusionslevel ohne TetR mit TetR und Doxycyclin nicht mehr erreicht werden. Dies spricht für eine unvollständige Ablösung des Proteins vom Aptamer, die eventuell über eine höhere Doxycyclinkonzentration korrigiert werden könnte.

Der stärkste Effekt konnte mit dem Fusionsprotein aus TetR und dem *silencer* hnRNP A1 erreicht werden. Hierbei handelt es sich auch um das größte der eingesetzten TetR-Fusionsproteine. Möglicherweise ist der Effekt demnach auf die Größe des Proteins und die damit verbundene stärkere Blockade der Spleißstelle zurückzuführen. Hier wurde die Repressordomäne des Spleiß*silencers* verwendet. Das Fusionsprotein scheint jedoch nicht als *silencer* zu wirken. Dies wurde bereits im pMA-Minigen beobachtet (Abbildung 4-43). Eventuell überdeckt die größere TetR-Domäne des Proteins den Einfluss der Spleißregulator-domäne.

Für das Konstrukt mit dem Aptamer nahe der 5'-Spleißstelle wurden unterschiedliche Spleißstellen getestet, wobei jedoch nur die bereits im pMA-Minigen untersuchten Spleißstellen einen geringen Regulationseffekt mit TetR zeigten. Allerdings enthielt das Minigen von vorherigen Arbeiten eine Bindesequenz der PUF-Domäne des humanen Pumilio 1 Proteins im Exon 2.¹¹⁶ Pumilio 1 ist ein RNA bindendes Protein, was an der Kontrolle der mRNA Stabilität, Translation und Lokalisation beteiligt ist.¹³³ Dieses Protein

liegt in allen humanen Zellen vor und bindet wahrscheinlich auch an die Bindesequenz im Exon 2 des Minigens. Allein dadurch kann der Zugang zu den Spleißstellen am Exon 2 beeinflusst werden und somit auch das Spleißverhalten. Des Weiteren ist es möglich, dass durch die Bindung des Pumilio 1 Proteins die Bindung von TetR an sein Aptamer behindert wird. Um diese Theorien zu überprüfen, wurde die Bindesequenz aus dem Minigen entfernt und erneut das Spleißmuster analysiert. Durch die Deletion der Bindesequenz wurde das Spleißmuster stark zur Inklusion des Exon 2 verschoben, was dafür spricht, dass die Bindung des Pumilio 1 Proteins zuvor das Spleißen beeinflusste. Allerdings veränderte sich sowohl die Größe der PCR-Produkt stärker als erwartet, als auch das Verhältnis zwischen den beiden Inklusionsbanden. Demnach scheinen in diesem Minigen noch weitere Faktoren das Spleißen zu beeinflussen. Da darüber hinaus die Vektorsequenz des Minigens nicht komplett bekannt war, könnten auch *silencer* und *enhancer*-Effekte sowie kryptische Spleißstellen nicht ausgeschlossen werden. Daher wurde von weiteren Arbeiten mit diesem Minigen abgesehen.

Zusammenfassend konnte durch das GFP-Minigen gezeigt werden, dass auch in diesem System eine Spleißregulation möglich war. Die Regulation war jedoch nicht so prominent wie im pMA-Minigen. Das Spleißregulationssystem ist demnach bedingt in anderem Kontext einsetzbar, die Insertionsposition sowie der Sequenzkontext muss jedoch gegebenenfalls für jeden neuen Kontext angepasst werden.

5.3.3 Spleißregulation in der Luziferase-mRNA

Die im pMA-Minigen etablierte Spleißregulation sollte in den Kontext einer translatierten mRNA überführt werden. Hierzu wurden die besten Konstrukte aus dem pMA-Minigen in ein Luziferasegen integriert. Dabei war auffällig, dass in allen Varianten durch das inserierte Intron die Luziferaseaktivität niedriger war als in der ursprünglichen Luziferase. Dieser Effekt war unerwartet, da normalerweise die Insertion eines Introns die Translationseffizienz erhöht. Das Konstrukt mit dem Intron 2 allein („In II in Luci“) zeigte eine schlechtere Luziferaseaktivität als dasjenige, das beide Introns enthielt. Eventuell war die Insertionsstelle des Introns nicht optimal gewählt, obwohl versucht wurde den Kontext der Spleißstellen zu erhalten. Allerdings konnten nur die zur Spleißstelle benachbarten zwei bis drei Nukleotide berücksichtigt werden. Möglicherweise sollte darauf geachtet werden, dass ein größerer Teil des Kontextes erhalten bleibt.

Eine extrem geringe Luziferaseaktivität zeigte das Konstrukt mit Exon 2 und Intron 2 *upstream* des *Luziferasegens* („ExII + In II vor Luci“). Wurde jedoch das Exon 2 direkt an die Luziferase fusioniert, war die Enzymaktivität zwar beeinträchtigt durch die zusätzlichen Aminosäuren am N-Terminus, aber die Aktivität lag höher als wenn auch das Intron 2 5' des *Luziferasegens* inseriert wurde. Dies spricht dafür, dass das Spleißen des Introns in diesem

Konstrukt nicht gut funktionierte. Die niedrigen Aktivitätsmessungen der verschiedenen Luziferase-Konstrukte mit Introns deuten darauf hin, dass die Konstrukte von vorne herein nicht optimal gespleißt werden. Dies wäre eventuell durch eine Verkürzung des Introns oder die Variation der Intronposition optimierbar.

In den Minigendaten konnte durch das Konstrukt „i6u555 TetR Apt 5' SS“ in Abwesenheit von Doxycyclin eine komplette Exklusion erreicht werden. Durch das Konstrukt „i6u555 strong SS + TetR Apt 5' SS“ konnte jedoch in Anwesenheit von Doxycyclin eine komplette Inklusion erreicht werden (Abbildung 4-47). Um beides detektieren zu können wurden zwei Strategien verfolgt: In den Konstrukten mit Intron 2 oder 1 und 2 innerhalb der Luziferase bzw. dem Exon 2 und dem Intron 2 *upstream* des Luziferasegens, wird die Inklusion des Kassettenexons detektiert. Hier entsteht nur eine funktionelle Luziferase, wenn das Exon 2 inkludiert wird. Während das Konstrukt mit dem Intron 1, Exon 2 und Intron 2 in der Luziferase die Exklusion detektiert. Hier muss das Exon 2 heraus gespleißt werden, damit eine funktionelle Luziferase exprimiert werden kann.

Durch die Insertion des Aptamers wurde die Inklusion des Exons gesenkt. Dies wurde bereits im pMA-Minigen beobachtet, da durch das Aptamer der Zugang zur Spleißstelle verschlechtert wird. Durch die Insertion des Aptamers in das Konstrukt „In I + Ex II + In II in Luci“ wurde die Luziferaseaktivität gesteigert, da das Aptamer die Exklusion des unerwünschten Exons fördert.

In folgenden Konstrukten war ein Regulationseffekt durch TetR und Doxycyclin detektierbar: „In II + TetR Apt 5' SS in Luci“, „Ex II + In II str. SS + TetR Apt 5' SS vor Luci“, „In I + Ex II + In II + TetR Apt 5' SS in Luci“ und „In I + Ex II + In II + TetR Apt kurz 5' SS in Luci“. Der maximale Regulationsfaktor lag hier bei 1,7 für das kurze Aptamer mit einem 7 bp langen Stamm im Intron 2 des Konstrukts „In I + Ex II + In II + TetR Apt kurz 5' SS in Luci“. Durch Optimierung der Versuchsbedingungen konnte auch der Regulationsfaktor von „In II + TetR Apt kurz 5' SS in Luci“ auf 1,7 gesteigert werden. Durch neue Konstrukte mit der Kombination aus starker Spleißstelle und kurzem Aptamer im Intron 2 konnte der Regulationsfaktor nicht verbessert werden. Die weitere Destabilisation des Aptamers durch Kürzen des Stammes auf 6 bp und Variation der Aptamerposition in Bezug auf die 5'-Spleißstelle verbesserten den Regulationsfaktor nicht. Möglicherweise ist ein destabilisiertes Aptamer mit einem 6 bp langen Stamm in seiner Struktur zu flexibel, um den Zugang zur Spleißstelle effizient zu regulieren.

Insgesamt bestätigte sich auch in der Luziferase, dass das Aptamer mit dem 7 bp langen Stamm und die starke 5'-Spleißstelle die beste Regulation zeigte. Die Position des Aptamers direkt *downstream* der 5'-Spleißstelle erwies sich als optimal für die Spleißregulation.

Da TetR eine sehr hohe Affinität zu Tetrazyklin aufweist und in Medium für humane Zellen meist Tetrazyklin vorhanden ist, wurde getestet, ob sich der Regulationfaktor in tetrazyklinfreiem Medium verändert.⁴⁰ In Medium, welches auf Tetrazyklin getestetes fötales Kälberserum enthielt, wuchsen die Zellen jedoch unerklärlicher Weise wesentlich langsamer. Die bestimmten Regulationsfaktoren liegen hier leicht unterhalb der zuvor bestimmten Werte. Dies ist wahrscheinlich auf das schlechte Wachstum der Zellen zurückzuführen und lässt darauf schließen, dass auch das normale Medium kein Tetrazyklin in signifikanten Mengen enthielt.

Da die Effekte auf RNA-Ebene im Minigen wesentlich größer waren, sollte überprüft werden, ob der Regulationseffekt auf RNA-Ebene auch für die Luziferase größer ist und eventuell durch die Translation oder Proteinstabilität abgeschwächt wird. Um dies zu überprüfen, wurde die RNA aus transfizierten Zellen präpariert und in einer qRT-PCR die mRNA-Menge untersucht. Allerdings wurde mit der qRT-PCR keine Spleißvariante detektiert, sondern die Gesamtmenge an Luziferase-mRNA. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den mRNA-Mengen in An- und Abwesenheit von Doxycyclin. Normalerweise wird ungespleißte mRNA nicht exportiert und abgebaut. In diesem Fall wurde die RNA aus dem Kern nicht gesondert präpariert und dadurch mit der im Cytosol vereint, weshalb sowohl gespleißte als auch ungespleißte mRNA detektiert wurde. Des Weiteren handelt es sich bei dem eingebauten Intron nicht um ein natürliches Luziferaseintron, sondern um ein Intron aus einem Hamstergen. Eventuell wird dieses Intron nicht natürlich gespleißt und demnach auch nicht zum Abbau erkannt. Um den Zustand auf RNA-Ebene zu untersuchen sollte die RNA aus dem Zellkern und Cytosol getrennt präpariert und mit einer qRT-PCR analysiert werden. Allerdings ist eine PCR zur Analyse der Spleißvarianten über cDNA, wie das für die Minigene durchgeführt wurde, aussagekräftiger. Hier wären beide Spleißvarianten sichtbar und es könnte direkt beobachtet werden, wie gut die Luziferasevarianten mit Intron gespleißt werden und welchen Einfluss die Insertion des Aptamers alleine auf das Spleißen hat.

Zusammenfassend konnte der starke Regulationseffekt, der im Minigen beobachtet wurde, im mRNA-Kontext nur bedingt reproduziert werden. Der RNA-Schalter scheint sich demnach in einem mRNA-Kontext anders zu verhalten als in der artifiziellen Minigen-Umgebung. Eventuell ist das Aptamer allein auch nicht universell in beliebigem Kontext einsetzbar, sondern braucht eine optimale Minimalumgebung für einen hohen Regulationsfaktor.

5.3.4 Vergleich des Regulationsansatzes zur Spleißregulation

In Hefen konnte mit einem Tetrazyklin bindenden Aptamer nahe der 5'-Spleißstelle eine 16-fache Spleißregulation erreicht werden.⁶³ Hier zeigte sich eine starke Positionsabhängigkeit⁶³, die beim TetR bindenden Aptamer nicht zu beobachten war. In Hefen konnte der Spleißfaktor durch die Insertion eines zweiten Introns mit Aptamer

verdoppelt werden.⁶³ Dies wäre auch hier eine Option zur Optimierung der Spleißregulation mit dem TetR bindenden Aptamer. Beim Tetrazyklin bindenden Aptamer handelt es sich um ein Aptamer, welches einen kleinen Liganden bindet und eine sehr stabile Struktur einnimmt. Bei der besten Regulation wurde die Spleißstelle komplett in den Stamm des Aptamers integriert und so bei der Ligandbindung komplett maskiert.⁶³ Das TetR bindende Aptamer dagegen bindet ein Protein und liegt neben der Spleißstelle. Hier wird vor allem durch den großen Proteinliganden der Zugang zur Spleißstelle sterisch behindert und nicht durch das Aptamer selbst.

In einer andern Studie wurde mit dem das MS2-Protein bindenden Aptamer eine ähnliche Strategie zur Spleißregulation verfolgt und ein Regulationsfaktor von ca. 2 erreicht.⁶⁴ Der in dieser Arbeit erreichte Faktor von 1,7 bewegt sich demnach im gleichen Bereich.

5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden zum einen der Rec-RcRE-Komplex des humanen endogenen Retrovirus HERV-K untersucht. Im zweiten Teil wurden verschiedenen Strategien zur Etablierung synthetischer RNA basierter Genschalter verfolgt.

Es konnte gezeigt werden, dass Rec vor allem an die komplex gefaltete Struktur des RcRE pck30 bindet und die Bindung und der Exportkomplex eventuell durch die Erkennung von purinreichen Sequenzen stabilisiert werden. Es wird ein Rev ähnliches Bindungsmodell mit einer sequentiellen Bindung von Rec an den zentralen Bereich der RcRE pck30 mit der Bindung von weiteren Rec-Tetrameren an weniger affine Bindungsstellen angenommen. Hier wäre eine Kristallstruktur von Rec gebunden an das RcRE pck30 sehr interessant, um zu erfahren wie die drei Tetramere auf dem 429 nt langen RcRE pck30 binden.

Im synthetischen Teil dieser Arbeit wurde einerseits versucht, die Replikation von SFV durch RNA-Schalter zu regulieren. Dies war mit dem Tetrazyklin bindenden Aptamer im Bereich des subgenomischen Promotors nicht möglich. Eventuell müsste hier ein Aptamer verwendet werden, welches keine so stark vorgeformte Struktur wie das Tetrazyklin bindende Aptamer aufweist. Hier wäre z. B. das Theophyllin bindende Aptamer denkbar. Dabei würde sich allerdings das Problem der Unverträglichkeit von Theophyllin bei vielen Zellen ergeben, was jedoch durch den Wechsel der Zelllinie umgangen werden kann. Das Theophyllin abhängige *hammerhead* Ribozym wurde in den 3'-UTR von SFV inseriert. Hier konnte jedoch auch keine ligandabhängige Regulation beobachtet werden. Es ist möglich, dass das Ribozym nicht korrekt gefaltet war und somit nicht aktiv. Dies könnte möglicherweise durch die Anwesenheit weiterer RNA-Strukturen innerhalb des 3'-UTRs oder gebundener virale Proteine bedingt sein, welche mit der Ribozymsequenz wechselwirken. Hier empfiehlt sich eine Strukturanalyse des viralen UTRs mit und ohne Ribozym, um die Sekundärstrukturen zu

bestimmen und die Faltung des Ribozyms zu überprüfen. Ob die gefundenen Sekundärstrukturen funktionell wichtig sind, ließe sich durch Expressionsstudien viraler Gene während der Replikation mit deletierten oder mutierten Sekundärstrukturen im UTR untersuchen. Diese Arbeiten sind jedoch nur in einem viralen Arbeitskreis mit guter Kenntnis des Virus durchführbar.

Im dritten Projekt wurde das alternative Spleißen eines Minigens und einer mRNA durch das TetR bindende Aptamer reguliert. Im Minigen konnte das alternative Spleißen erfolgreich reguliert werden. Dies war jedoch nur bedingt auf den mRNA-Kontext übertragbar, da hier maximale Regulationsfaktoren von 1,7 erreicht wurden. Hier müsste das Testsystem mit dem Intron innerhalb der Luziferase optimiert werden. Es ist möglich, dass die Insertionsstelle des Introns nicht optimal gewählt war. Eventuell kann die Luziferaseexpression durch Kürzen des Introns verbessert werden. Des Weiteren wäre es interessant zu untersuchen, wie universell einsetzbar der RNA-Schalter ist, indem verschiedene Spleißstellen und Introns getestet werden. Das finale Ziel wäre eine Sequenzkassette mit einem Aptamer zu entwickeln, welche in jeder natürlichen mRNA mit alternativen Spleißvarianten einsetzbar ist.

6 Referenzen

1. Serganov, A. & Nudler, E. A decade of riboswitches. *Cell* **152**, 17-24 (2013).
2. Gilbert, S.D., Rambo, R.P., Van Tyne, D. & Batey, R.T. Structure of the SAM-II riboswitch bound to S-adenosylmethionine. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 177-82 (2008).
3. Lu, C. et al. Crystal structures of the SAM-III/S(MK) riboswitch reveal the SAM-dependent translation inhibition mechanism. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 1076-83 (2008).
4. Montange, R.K. & Batey, R.T. Structure of the S-adenosylmethionine riboswitch regulatory mRNA element. *Nature* **441**, 1172-5 (2006).
5. Winkler, W., Nahvi, A. & Breaker, R.R. Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* **419**, 952-6 (2002).
6. Nahvi, A. et al. Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chem Biol* **9**, 1043 (2002).
7. Mironov, A.S. et al. Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria. *Cell* **111**, 747-56 (2002).
8. Winkler, W.C., Nahvi, A., Roth, A., Collins, J.A. & Breaker, R.R. Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature* **428**, 281-6 (2004).
9. Collins, J.A., Irnov, I., Baker, S. & Winkler, W.C. Mechanism of mRNA destabilization by the glmS ribozyme. *Genes Dev* **21**, 3356-68 (2007).
10. Watson, P.Y. & Fedor, M.J. The glmS riboswitch integrates signals from activating and inhibitory metabolites in vivo. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 359-63 (2011).
11. Cheah, M.T., Wachter, A., Sudarsan, N. & Breaker, R.R. Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches. *Nature* **447**, 497-500 (2007).
12. Mandal, M. et al. A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression. *Science* **306**, 275-9 (2004).
13. Kortmann, J. & Narberhaus, F. Bacterial RNA thermometers: molecular zippers and switches. *Nat Rev Microbiol* **10**, 255-65 (2012).
14. Loh, E. et al. A trans-acting riboswitch controls expression of the virulence regulator PrfA in *Listeria monocytogenes*. *Cell* **139**, 770-9 (2009).
15. Weigand, J.E. & Suess, B. Aptamers and riboswitches: perspectives in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**, 229-36 (2009).
16. Stoltenburg, R., Reinemann, C. & Strehlitz, B. SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol Eng* **24**, 381-403 (2007).
17. Ellington, A.D. & Szostak, J.W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**, 818-22 (1990).
18. Tuerk, C. & Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**, 505-10 (1990).
19. Berens, C., Thain, A. & Schroeder, R. A tetracycline-binding RNA aptamer. *Bioorg Med Chem* **9**, 2549-56 (2001).
20. Epe, B., Woolley, P. & Hornig, H. Competition between tetracycline and tRNA at both P and A sites of the ribosome of *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **213**, 443-7 (1987).
21. Spahn, C.M. & Prescott, C.D. Throwing a spanner in the works: antibiotics and the translation apparatus. *J Mol Med (Berl)* **74**, 423-39 (1996).
22. Forster, U., Weigand, J.E., Trojanowski, P., Suess, B. & Wachtveitl, J. Conformational dynamics of the tetracycline-binding aptamer. *Nucleic Acids Res* **40**, 1807-17 (2012).
23. Hanson, S., Bauer, G., Fink, B. & Suess, B. Molecular analysis of a synthetic tetracycline-binding riboswitch. *RNA* **11**, 503-11 (2005).
24. Xiao, H., Edwards, T.E. & Ferre-D'Amare, A.R. Structural basis for specific, high-affinity tetracycline binding by an in vitro evolved aptamer and artificial riboswitch. *Chem Biol* **15**, 1125-37 (2008).
25. Muller, M., Weigand, J.E., Weichenrieder, O. & Suess, B. Thermodynamic characterization of an engineered tetracycline-binding riboswitch. *Nucleic Acids Res* **34**, 2607-17 (2006).

26. Wunnicke, D. et al. Ligand-induced conformational capture of a synthetic tetracycline riboswitch revealed by pulse EPR. *RNA* **17**, 182-8 (2011).
27. Suess, B. et al. Conditional gene expression by controlling translation with tetracycline-binding aptamers. *Nucleic Acids Res* **31**, 1853-8 (2003).
28. Hanson, S., Berthelot, K., Fink, B., McCarthy, J.E. & Suess, B. Tetracycline-aptamer-mediated translational regulation in yeast. *Mol Microbiol* **49**, 1627-37 (2003).
29. Kotter, P., Weigand, J.E., Meyer, B., Entian, K.D. & Suess, B. A fast and efficient translational control system for conditional expression of yeast genes. *Nucleic Acids Res* **37**, e120 (2009).
30. Weinberger, M. & Hendeles, L. Theophylline for chronic asthma: rationale for treatment, product selection, and dosage schedule. *Pediatr Pharmacol (New York)* **3**, 273-85 (1983).
31. Jenison, R.D., Gill, S.C., Pardi, A. & Polisky, B. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science* **263**, 1425-9 (1994).
32. Latham, M.P., Zimmermann, G.R. & Pardi, A. NMR chemical exchange as a probe for ligand-binding kinetics in a theophylline-binding RNA aptamer. *J Am Chem Soc* **131**, 5052-3 (2009).
33. Harvey, I., Garneau, P. & Pelletier, J. Inhibition of translation by RNA-small molecule interactions. *RNA* **8**, 452-63 (2002).
34. Suess, B., Fink, B., Berens, C., Stentz, R. & Hillen, W. A theophylline responsive riboswitch based on helix slipping controls gene expression in vivo. *Nucleic Acids Res* **32**, 1610-4 (2004).
35. An, C.I., Trinh, V.B. & Yokobayashi, Y. Artificial control of gene expression in mammalian cells by modulating RNA interference through aptamer-small molecule interaction. *RNA* **12**, 710-6 (2006).
36. Wachsmuth, M., Findeiss, S., Weissheimer, N., Stadler, P.F. & Morl, M. De novo design of a synthetic riboswitch that regulates transcription termination. *Nucleic Acids Res* **41**, 2541-51 (2012).
37. Hillen, W., Gatz, C., Altschmied, L., Schollmeier, K. & Meier, I. Control of expression of the Tn10-encoded tetracycline resistance genes. Equilibrium and kinetic investigation of the regulatory reactions. *J Mol Biol* **169**, 707-21 (1983).
38. Hillen, W. & Berens, C. Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol* **48**, 345-69 (1994).
39. Eckert, B. & Beck, C.F. Overproduction of transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein results in cell death and loss of membrane potential. *J Bacteriol* **171**, 3557-9 (1989).
40. Hinrichs, W. et al. Structure of the Tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance. *Science* **264**, 418-20 (1994).
41. Gossen, M. & Bujard, H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5547-51 (1992).
42. Kohan, D.E. Progress in gene targeting: using mutant mice to study renal function and disease. *Kidney Int* **74**, 427-37 (2008).
43. Urlinger, S. et al. Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7963-8 (2000).
44. Hunsicker, A. et al. An RNA aptamer that induces transcription. *Chem Biol* **16**, 173-80 (2009).
45. Steber, M., Arora, A., Hofmann, J., Brutschy, B. & Suess, B. Mechanistic basis for RNA aptamer-based induction of TetR. *Chembiochem* **12**, 2608-14 (2011).
46. Auslander, D., Wieland, M., Auslander, S., Tigges, M. & Fussenegger, M. Rational design of a small molecule-responsive intramer controlling transgene expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **39**, e155 (2011).
47. Belmont, B.J. & Niles, J.C. Engineering a direct and inducible protein-RNA interaction to regulate RNA biology. *ACS Chem Biol* **5**, 851-61 (2010).

48. Goldfless, S.J., Belmont, B.J., de Paz, A.M., Liu, J.F. & Niles, J.C. Direct and specific chemical control of eukaryotic translation with a synthetic RNA-protein interaction. *Nucleic Acids Res* **40**, e64 (2012).
49. Belmont, B.J. & Niles, J.C. Inducible control of subcellular RNA localization using a synthetic protein-RNA aptamer interaction. *PLoS One* **7**, e46868 (2012).
50. Cochrane, J.C. & Strobel, S.A. Catalytic strategies of self-cleaving ribozymes. *Acc Chem Res* **41**, 1027-35 (2008).
51. Ferre-D'Amare, A.R. & Scott, W.G. Small self-cleaving ribozymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a003574 (2010).
52. Tang, J. & Breaker, R.R. Rational design of allosteric ribozymes. *Chem Biol* **4**, 453-9 (1997).
53. Win, M.N. & Smolke, C.D. A modular and extensible RNA-based gene-regulatory platform for engineering cellular function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14283-8 (2007).
54. Chen, Y.Y., Jensen, M.C. & Smolke, C.D. Genetic control of mammalian T-cell proliferation with synthetic RNA regulatory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 8531-6 (2010).
55. Wieland, M. & Hartig, J.S. Improved aptazyme design and in vivo screening enable riboswitching in bacteria. *Angew Chem Int Ed Engl* **47**, 2604-7 (2008).
56. Auslander, S., Ketzer, P. & Hartig, J.S. A ligand-dependent hammerhead ribozyme switch for controlling mammalian gene expression. *Mol Biosyst* **6**, 807-14 (2010).
57. Will, C.L. & Luhrmann, R. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3** (2011).
58. Matlin, A.J., Clark, F. & Smith, C.W. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 386-98 (2005).
59. Wang, Z. & Burge, C.B. Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA* **14**, 802-13 (2008).
60. Blencowe, B.J. Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell* **126**, 37-47 (2006).
61. Spitalli, P. & Aartsma-Rus, A. Splice modulating therapies for human disease. *Cell* **148**, 1085-8 (2012).
62. Li, S. & Breaker, R.R. Eukaryotic TPP riboswitch regulation of alternative splicing involving long-distance base pairing. *Nucleic Acids Res* **41**, 3022-31 (2013).
63. Weigand, J.E. & Suess, B. Tetracycline aptamer-controlled regulation of pre-mRNA splicing in yeast. *Nucleic Acids Res* **35**, 4179-85 (2007).
64. Culler, S.J., Hoff, K.G. & Smolke, C.D. Reprogramming cellular behavior with RNA controllers responsive to endogenous proteins. *Science* **330**, 1251-5 (2010).
65. Flint, S.J., Enquist, L.W., Racaniello, V.R. & Skalka, A.M. Principles of Virology (ASM Press, 2009).
66. Modrow, S., Falke, D., Truyen, U. & Schätzl, H. Molekulare Virologie (Springer Spektrum, 2010).
67. Strauss, J.H. & Strauss, E.G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev* **58**, 491-562 (1994).
68. Helenius, A. et al. Human (HLA-A and HLA-B) and murine (H-2K and H-2D) histocompatibility antigens are cell surface receptors for Semliki Forest virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 3846-50 (1978).
69. Liljestrom, P. & Garoff, H. A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Biotechnology (N Y)* **9**, 1356-61 (1991).
70. Quetglas, J.I. et al. Alphavirus vectors for cancer therapy. *Virus Res* **153**, 179-96 (2010).
71. Glasgow, G.M. et al. The Semliki Forest virus vector induces p53-independent apoptosis. *J Gen Virol* **79** (Pt 10), 2405-10 (1998).
72. Casales, E. et al. Development of a new noncytopathic Semliki Forest virus vector providing high expression levels and stability. *Virology* **376**, 242-51 (2008).
73. Lundstrom, K. Alphaviruses in gene therapy. *Viruses* **1**, 13-25 (2009).

74. Tamberg, N. et al. Insertion of EGFP into the replicase gene of Semliki Forest virus results in a novel, genetically stable marker virus. *J Gen Virol* **88**, 1225-30 (2007).
75. Rausalu, K. et al. Properties and use of novel replication-competent vectors based on Semliki Forest virus. *Virology* **6**, 33 (2009).
76. Quetglas, J.I. et al. A Semliki forest virus vector engineered to express IFNalpha induces efficient elimination of established tumors. *Gene Ther* **19**, 271-8 (2011).
77. Kamrud, K.I. et al. In vitro and in vivo characterization of microRNA-targeted alphavirus replicon and helper RNAs. *J Virol* **84**, 7713-25 (2010).
78. Tseng, J.C. et al. Tumor-specific in vivo transfection with HSV-1 thymidine kinase gene using a Sindbis viral vector as a basis for prodrug ganciclovir activation and PET. *J Nucl Med* **47**, 1136-43 (2006).
79. Gopinath, S.C., Hayashi, K. & Kumar, P.K. Aptamer that binds to the gD protein of herpes simplex virus 1 and efficiently inhibits viral entry. *J Virol* **86**, 6732-44 (2012).
80. Romero-Lopez, C., Berzal-Herranz, B., Gomez, J. & Berzal-Herranz, A. An engineered inhibitor RNA that efficiently interferes with hepatitis C virus translation and replication. *Antiviral Res* **94**, 131-8 (2012).
81. Wang, S. & White, K.A. Riboswitching on RNA virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10406-11 (2007).
82. Ketzer, P., Haas, S.F., Engelhardt, S., Hartig, J.S. & Nettelbeck, D.M. Synthetic riboswitches for external regulation of genes transferred by replication-deficient and oncolytic adenoviruses. *Nucleic Acids Res* **40**, e167 (2012).
83. Balvay, L., Lastra, M.L., Sargueil, B., Darlix, J.L. & Ohlmann, T. Translational control of retroviruses. *Nature Reviews Microbiology* **5**, 128-140 (2007).
84. Murphy, K., Traver, P., Walport, M., Ehrenstein, M. & Janeway, C. Janeway's Immunobiology (Garland Science, New York, 2008).
85. Lower, R., Lower, J. & Kurth, R. The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5177-84 (1996).
86. Barbulescu, M. et al. Many human endogenous retrovirus K (HERV-K) proviruses are unique to humans. *Curr Biol* **9**, 861-8 (1999).
87. Hughes, J.F. & Coffin, J.M. Evidence for genomic rearrangements mediated by human endogenous retroviruses during primate evolution. *Nat Genet* **29**, 487-9 (2001).
88. Singh, S., Kaye, S., Gore, M.E., McClure, M.O. & Bunker, C.B. The role of human endogenous retroviruses in melanoma. *Br J Dermatol* **161**, 1225-31 (2009).
89. Larsson, E., Kato, N. & Cohen, M. Human endogenous proviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **148**, 115-32 (1989).
90. Tonjes, R.R. et al. HERV-K: the biologically most active human endogenous retrovirus family. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **13 Suppl 1**, S261-7 (1996).
91. Mayer, J. et al. Human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) proviruses with Rec protein coding capacity and transcriptional activity. *Virology* **322**, 190-8 (2004).
92. Reynier, F. et al. Increase in Human Endogenous Retrovirus HERV-K (HML-2) Viral Load in Active Rheumatoid Arthritis. *Scandinavian Journal of Immunology* **70**, 295-299 (2009).
93. Contreras-Galindo, R. et al. Human endogenous retrovirus K (HML-2) elements in the plasma of people with lymphoma and breast cancer. *J Virol* **82**, 9329-36 (2008).
94. Muster, T. et al. An endogenous retrovirus derived from human melanoma cells. *Cancer Res* **63**, 8735-41 (2003).
95. Stengel, S., Fiebig, U., Kurth, R. & Denner, J. Regulation of human endogenous retrovirus-K expression in melanomas by CpG methylation. *Genes Chromosomes Cancer* **49**, 401-11 (2010).
96. Serafino, A. et al. The activation of human endogenous retrovirus K (HERV-K) is implicated in melanoma cell malignant transformation. *Exp Cell Res* **315**, 849-62 (2009).

97. Yang, J. et al. An ancient family of human endogenous retroviruses encodes a functional homolog of the HIV-1 Rev protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13404-8 (1999).
98. Magin, C., Lower, R. & Lower, J. cORF and RcRE, the Rev/Rex and RRE/RxRE homologues of the human endogenous retrovirus family HTDV/HERV-K. *J Virol* **73**, 9496-507 (1999).
99. Hahn, S. 130 (Phillips-Universität, Marburg, 2004).
100. Lower, R., Tonjes, R.R., Korbmacher, C., Kurth, R. & Lower, J. Identification of a Rev-related protein by analysis of spliced transcripts of the human endogenous retroviruses HTDV/HERV-K. *J Virol* **69**, 141-9 (1995).
101. Magin, C., Hesse, J., Lower, J. & Lower, R. Corf, the Rev/Rex homologue of HTDV/HERV-K, encodes an arginine-rich nuclear localization signal that exerts a trans-dominant phenotype when mutated. *Virology* **274**, 11-6 (2000).
102. Boese, A. et al. Human endogenous retrovirus protein cORF supports cell transformation and associates with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Oncogene* **19**, 4328-36 (2000).
103. Galli, U.M. et al. Human endogenous retrovirus rec interferes with germ cell development in mice and may cause carcinoma in situ, the predecessor lesion of germ cell tumors. *Oncogene* **24**, 3223-8 (2005).
104. Buscher, K. et al. Expression of the human endogenous retrovirus-K transmembrane envelope, Rec and Np9 proteins in melanomas and melanoma cell lines. *Melanoma Res* **16**, 223-34 (2006).
105. Denne, M. et al. Physical and functional interactions of human endogenous retrovirus proteins Np9 and rec with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Journal of Virology* **81**, 5607-5616 (2007).
106. McConnell, M.J. et al. Growth suppression by acute promyelocytic leukemia-associated protein PLZF is mediated by repression of c-myc expression. *Mol Cell Biol* **23**, 9375-88 (2003).
107. Chen, Z. et al. Fusion between a novel Kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-alpha locus due to a variant t(11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J* **12**, 1161-7 (1993).
108. Chen, S.J. et al. Rearrangements of the retinoic acid receptor alpha and promyelocytic leukemia zinc finger genes resulting from t(11;17)(q23;q21) in a patient with acute promyelocytic leukemia. *J Clin Invest* **91**, 2260-7 (1993).
109. Kaufmann, S. et al. Human Endogenous Retrovirus Protein Rec interacts with the Testicular Zinc Finger Protein and Androgen Receptor. *J Gen Virol* (2010).
110. Inoue, A. et al. The transcript for a novel protein with a zinc finger motif is expressed at specific stages of mouse spermatogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **273**, 398-403 (2000).
111. Lin, W., Lai, C.H., Tang, C.J., Huang, C.J. & Tang, T.K. Identification and gene structure of a novel human PLZF-related transcription factor gene, TZFP. *Biochem Biophys Res Commun* **264**, 789-95 (1999).
112. Magin-Lachmann, C. et al. Rec (formerly Corf) function requires interaction with a complex, folded RNA structure within its responsive element rather than binding to a discrete specific binding site. *J Virol* **75**, 10359-71 (2001).
113. Langner, J.S. et al. Biochemical analysis of the complex between the tetrameric export adapter protein Rec of HERV-K/HML-2 and the responsive RNA element RcRE pck30. *J Virol* **86**, 9079-87 (2012).
114. Sobott, F., Wattenberg, A., Kleinekofort, W., Pfenninger, A. & Brutschy, B. Laser desorption mass spectrometry on thin liquid jets. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **360**, 745-749 (1998).
115. Langner, J. in Fachbereich Biochemie (Goethe Universität, Frankfurt am Main, 2010).
116. Wang, Y., Cheong, C.G., Hall, T.M. & Wang, Z. Engineering splicing factors with designed specificities. *Nat Methods* **6**, 825-30 (2009).
117. Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989).

Referenzen

118. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5 (1970).
119. Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, New York, 1989).
120. Hanahan, D., Jessee, J. & Bloom, F.R. Plasmid transformation of Escherichia-Coli and other bacteria. *Methods in Enzymology* **204**, 63-113 (1991).
121. Landt, O., Grunert, H.P. & Hahn, U. A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Gene* **96**, 125-8 (1990).
122. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54 (1976).
123. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* **24**, 104-8 (1992).
124. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4 (1979).
125. Zhang, X.H. & Chasin, L.A. Computational definition of sequence motifs governing constitutive exon splicing. *Genes Dev* **18**, 1241-50 (2004).
126. Roca, X., Sachidanandam, R. & Krainer, A.R. Determinants of the inherent strength of human 5' splice sites. *RNA* **11**, 683-98 (2005).
127. Malim, M.H. et al. HIV-1 structural gene expression requires binding of the Rev trans-activator to its RNA target sequence. *Cell* **60**, 675-83 (1990).
128. Daugherty, M.D., Liu, B. & Frankel, A.D. Structural basis for cooperative RNA binding and export complex assembly by HIV Rev. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 1337-42 (2010).
129. Daugherty, M.D., Booth, D.S., Jayaraman, B., Cheng, Y. & Frankel, A.D. HIV Rev response element (RRE) directs assembly of the Rev homooligomer into discrete asymmetric complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 12481-6 (2010).
130. Wittmann, A. & Suess, B. Selection of tetracycline inducible self-cleaving ribozymes as synthetic devices for gene regulation in yeast. *Mol Biosyst* **7**, 2419-27 (2011).
131. Topp, S. & Gallivan, J.P. Riboswitches in unexpected places--a synthetic riboswitch in a protein coding region. *RNA* **14**, 2498-503 (2008).
132. Buratti, E. & Baralle, F.E. Influence of RNA secondary structure on the pre-mRNA splicing process. *Mol Cell Biol* **24**, 10505-14 (2004).
133. Wickens, M., Bernstein, D.S., Kimble, J. & Parker, R. A PUF family portrait: 3'UTR regulation as a way of life. *Trends Genet* **18**, 150-7 (2002).

7 Lebenslauf

Janina Langner

geboren am 04.10.1986 in Frankfurt am Main

Juni 2010 – Oktober 2013

Promotion

im Arbeitskreis von Prof. Beatrix Süß
an der Technischen Universität in Darmstadt
Thema: Synthetische RNA-Schalter zur Regulation
zellulärer Prozesse

September 2009 – April 2010

Diplomarbeit

im Arbeitskreis von Prof. Beatrix Süß
an der Goethe Universität in Frankfurt am Main
Thema: Strukturelle Charakterisierung der RcRE des
Rec-Proteins von HERV-K

Oktober 2005 – September 2009

Studium der Biochemie

an der Goethe Universität in Frankfurt am Main
Abschluss: Diplom Biochemie

1996 - Juni 2005

Gymnasium

Elisabethen Schule in Frankfurt am Main
Abschluss: Abitur

8 Publikationen

Biochemical analysis of the complex between the tetrameric export adapter protein Rec of HERV-K/HML-2 and the responsive RNA element RcRE pck30.

Langner JS, Fuchs NV, Hoffmann J, Wittmann A, Brutschy B, Löwer R, Suess B.

J Virol. 2012 Sep;86(17):9079-87

Chimeric platinum-polyamines and DNA binding. Kinetics of DNA interstrand cross-link formation by dinuclear platinum complexes with polyamine linkers

Ruhayel RA, **Langner JS**, Oke MJ, Berners-Price SJ, Zgani I, Farrell NP.

J Am Chem Soc. 2012 Apr 25;134(16):7135-46

Präsentationen

7^{tes} Treffen der GBM Studiengruppe RNA-Biochemie, 2012 in Bonn (Poster)

22^{ste} Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, 2012 in Essen (Poster)

Rabensteiner Kolleg, 2012 in Pottenstein (Präsentation)

Rabensteiner Kolleg, 2012 in Pottenstein (Präsentation)

Winter und Sommerschule des GRK1172 von 2010 bis 2013 (Präsentation)

RNA-Club, 2010 in Frankfurt am Main (Präsentation)

9 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den 02.10.2013

(Janina Langner)